



**FACULTADE DE MEDICINA E  
ODONTOLOXÍA**

Departamento de Anatomía Patolóxica  
e Ciencias Forenses

**UTILIZACIÓN DE MUESTRAS ALTERNATIVAS EN LA  
DETECCIÓN PRECOZ DEL CONSUMO DE DROGAS DE  
ABUSO DURANTE LA GESTACIÓN**

Memoria presentada por:

**Patricia López Eijo**

Para optar al grado de  
Doctor por la Universidad  
de Santiago de Compostela

**Santiago de Compostela, marzo 2010**





## FACULTADE DE MEDICINA E ODONTOLOXÍA

Departamento de Anatomía Patolóxica  
e Ciencias Forenses

**Dña. Ana María Bermejo Barrera**, Catedrática de Toxicología, **Dña. María Jesús Tabernero Duque**, Investigadora del Instituto de Medicina Legal, y **Dña. Purificación Fernández Gómez**, Catedrática de Toxicología de la Universidad de Santiago de Compostela

### **Certifican:**

Que la presente memoria, titulada "UTILIZACIÓN DE MUESTRAS ALTERNATIVAS EN LA DETECCIÓN PRECOZ DEL CONSUMO DE DROGAS DE ABUSO DURANTE LA GESTACIÓN" que presenta la Licenciada **Patricia López Eijo** para optar al grado de Doctor ha sido realizada bajo su dirección en este Departamento y, a su juicio, reúne todos los requisitos exigidos por la normativa vigente para la elaboración y presentación de Tesis Doctorales.

Y para que así conste, firman el presente informe en Santiago de Compostela, a 31 de Marzo de 2010.

Ana María Bermejo Barrera

María Jesús Tabernero Duque

Purificación Fernández Gómez





***A meus pais***



## Agradecimientos

Quero agradecer en primeiro lugar á Profa. Ana María Bermejo Barrera, catedrática de Toxicoloxía da USC, por dirixir esta Tese e por todo o apoio e axuda prestada na elaboración da mesma.

A María Jesús Tabernero Duque, investigadora do Instituto de Medicina Legal, polas súas valiosas suxerencias e acertados aportes durante o desenvolvemento deste traballo.

Á Profa. Purificación Fernández Gómez, catedrática de Toxicoloxía da USC, por estar sempre dispoñible a todo canto precisase.

Ó Prof. Antonio Moreda, polo seu aporte estatístico a esta Tese.

Ós meus compañeiros de laboratorio, tanto ós que xa se foron (Puri, Marta Lago, Cathy, Santi e Oscar) como ós que aínda están (Pamela, Martha, Iván, Dani, Marta, Ana, Marisol, Elena e Salva) por facer máis agradable a vida diaria do laboratorio. En especial a Pamela, coa que compartín tantos momentos no laboratorio e fora del; e a Dani, pola súa permanente disposición e desinteresada axuda. Agradecerlle tamén a José Manuel, a súa valiosa axuda co sempre interminable “papeleo”.

Ai miei collegui di l'Università Cattolica (Eleonora, Simona, Marialinda, Fede e Remo) per avermi accolto con tanto calore e per farmi sentire a casa pur essendo lontano da questa. In particolare, al Proff. Chiarotti, i cui consigli sono risultati utilissimi e per il tempo dedicato a rispondere alle mie domande.

A Sabina por su ayuda en la búsqueda de alojamiento en Roma, y por estar pendiente de mí durante mi estancia en la ciudad.

Ós meus compañeiros de carreira: Cris, Ana, Rosa e Migui, cos que compartín tantos e tan bos momentos en Santiago e cos que espero seguir compartindo moitos máis. Chegou o momento de emprender un novo camiño (espero que prometedor para todos!), seguramente nunca voverei a ter o privilexio de tervos tan cerquiña, pero a vosa

compañía ó longo destes anos será un recordo que nunca se borrará do meu corazón. Deséxovos todo o mellor!

Ás miñas amigas de Burela (Xoli, Tere, Su, Eva, María, Mónica e Zaki) e a Mery, Juan e Martín, por ser a miña vía de escape sempre que precisei desconectar do mundo da investigación, e por compartir comigo moito máis que esta Tese.

Ós meus avós, meu irmán, miña cuñada e a toda a miña familia polo voso constante apoio. Tamén a Álvaro, e en especial á miña pequeniña por facerme rir cada día e por contaxiarme a súa alegría de vivir.

A Diego, por escoitarme, entenderme e apoiarme incondicionalmente; e sobre todo por aguantarme nestes días de estres final, que sei que non foi fácil!. Sen ti este camiño sería aínda moito máis duro, grazas por estar ó meu lado e ser parte da miña vida, es o mellor que me pasou nunca. Quérote.

E por último, un agradecemento moi especial a meus pais, que constantemente me brindaron todo o apoio necesario para alcanzar as miñas metas e os meus sonos e estiveron sempre ó meu lado cada día da miña vida, compartindo os bos e os malos momentos. Grazas por confiar en min, sen vós nunca chegaría ata aquí. Quérovos.

## Índice General

<b>CAPÍTULO 1.</b> INTRODUCCIÓN: COCAÍNA .....	1
<b>CAPÍTULO 2.</b> INTRODUCCIÓN: OPIOIDES.....	21
<b>CAPÍTULO 3.</b> INTRODUCCIÓN: DROGAS Y EMBARAZO .....	41
<b>CAPÍTULO 4.</b> INTRODUCCIÓN: DETECCIÓN DE DROGAS EN EL EMBARAZO .....	71
<b>CAPÍTULO 5.</b> METODOLOGÍA GC-MS .....	143
<b>CAPÍTULO 6.</b> JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....	161
<b>CAPÍTULO 7.</b> EXPERIMENTAL: DETERMINACIÓN DE COCAÍNA Y OPIOIDES EN PELO POR GC-MS .....	167
<b>CAPÍTULO 8.</b> EXPERIMENTAL: APLICACIÓN A MUESTRAS DE VELLO PÚBLICO MATERNO Y CABELLO DEL RECIÉN NACIDO.....	197
<b>CAPÍTULO 9.</b> EXPERIMENTAL: DETERMINACIÓN DE COCAÍNA Y OPIOIDES EN MECONIO POR GC-MS.....	227
<b>CAPÍTULO 10.</b> EXPERIMENTAL: APLICACIÓN A MUESTRAS DE VELLO PÚBLICO MATERNO Y MECONIO.....	263
<b>CAPÍTULO 11.</b> DISCUSIÓN.....	287
<b>CAPÍTULO 12.</b> CONCLUSIONES .....	323



## Abreviaturas

6-MAM	6-monoacetilmorfina
AC	Adenilciclase
AED	Detector de emisión atómica
AEME	Anhidroecgonina metil éster
AIA	Inmunoensayo de aglutinación
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ASPE	Extracción en fase sólida automática
BE	Benzoilecgonina
BSID	Escala de Bayley de desarrollo infantil
BSTFA	N,O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida
C6G	Codeína- 6-O-β-D-glucurónido
CE	Cocaetileno
CI	Ionización química
Cir	Crecimiento intrauterino retardado
COC	Cocaína
COD	Codeína
CV	Coefficiente de variación
DAD	Detector array de diodos
ECD	Detector de captura electrónica
ECG	Ecgonina
EI	Impacto electrónico
EIA	Enzimoimmunoensayo
ELCD	Detector de conductividad electrolítica
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
EME	Ecgonina metil éster
EMIT	Inmunoensayo multiplicado por enzimas
F	Feto
FAD	Flavina adenina dinucleótido
FDA	Food and Drug Administration
FID	Detector de ionización de llama
FM	Fumada

FPD	Detector fotométrico de llama
FPIA	Inmunoensayo de polarización de fluorescencia
FTIR	Detector de infrarrojos por transformada de Fourier
GC	Cromatografía de gases
GLC	Cromatografía gas-líquido
GSC	Cromatografía gas-sólido
HER	Heroína
HID	Detector de ionización de helio
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HS-SPME	Microextracción en fase sólida por espacio de cabeza
I	Inhalada
ICH	International Conference Harmonisation
IFA	Fluoroinmunoensayo
IM	Intramuscular
IN	Intranasal
IP	Intrapulmonar
IUML	Instituto Universitario de Medicina Legal
IV	Intravenosa
KIMS	Interacción cinética de partículas en inmunoensayo de solución
LC	Cromatografía líquida
LLE	Extracción líquido-líquido
LLOQ	Límite inferior de cuantificación
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
LSD	Dietilamida del ácido lisérgico-d
M	Madre
m/z	Relación masa/carga
M3G	Morfina-3-glucurónido
M6G	Morfina-6-glucurónido
MOR	Morfina
MRE	Error medio relativo
MS	Espectrometría de masas
MSD	Detector selectivo de masas



NAS	Síndrome de abstinencia neonatal
NBE	Norbenzoilecgonina
NCE	Norcocaetileno
NCI	Ionización química negativa
NCO	Norcocaína
NCOD	Norcodeína
N-HONCO	N-hidroxinorcocaína
NMOR	Normorfina
NPD	Detector nitrógeno-fósforo
O	Oral
OED	Observatorio Español sobre Drogas
PCI	Ionización química positiva
PCP	Fenciclidina
PDMS	Escala de Peabody de desarrollo motor
PI	Patrón interno
PID	Detector de fotoionización
R	Recuperación
RC	Rectal
RIA	Radioinmunoensayo
RN	Recién nacido
RSD	Desviación estándar relativa
SC	Subcutánea
SCAN	Modalidad de barrido de iones
SFE	Extracción con fluidos supercríticos
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SIM	Monitorización de iones seleccionados
SNC	Sistema nervioso central
SoHT	Sociedad del análisis del pelo
SPE	Extracción en fase sólida
SPME	Microextracción en fase sólida
TCD	Detector de conductividad térmica
TD	Desorción térmica
TID	Detector de ionización termoiónica

TLC	Cromatografía en capa fina
TMCS	Clorotrimetilsilano
TMS	Trimetilsililo
ULOQ	Límite de cuantificación superior
UV	Ultravioleta
VHB	Virus de la hepatitis B
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana



# Capítulo

# 1

## Introducción: Cocaína



## Capítulo 1. Introducción: Cocaína

<b>1.1</b>	ESTRUCTURA QUÍMICA Y PROPIEDADES .....	5
<b>1.2</b>	FORMAS DE ABUSO.....	7
<b>1.3</b>	PREVALENCIA DE CONSUMO .....	8
<b>1.4</b>	FARMACOCINÉTICA .....	9
<b>1.4.1</b>	ABSORCIÓN Y CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS .....	9
<b>1.4.2</b>	DISTRIBUCIÓN .....	10
<b>1.4.3</b>	METABOLISMO .....	11
<b>1.4.4</b>	EXCRECIÓN .....	15
<b>1.5</b>	MECANISMO DE ACCIÓN .....	16
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19



## 1.1 ESTRUCTURA QUÍMICA Y PROPIEDADES

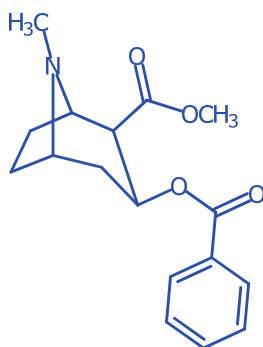
La cocaína ( $C_{17}H_{21}NO_4$ , COC) es el alcaloide principal de las hojas de algunas plantas del género *Erythroxylon* (*Erythroxylon* Coca, *Erythroxylon* Novogranatense y *Erythroxylon* Truxillense), en las cuales fue hallada por Friedrich Gaedcke en 1855, quien le dio el nombre de eritroxilina. Posteriormente fue aislada por Albert Niemann de las hojas de *Erythroxylon* Coca (Figura 1.1) en 1859.



**Figura 1.1.** *Erythroxylon* Coca.

Pertenece al grupo de los alcaloides tropánicos, su núcleo fundamental es el tropano, el cual es producto de la condensación de un anillo de cinco miembros o-pirrolidínico y otro de seis miembros o-piperidínico con tres átomos comunes, dos de carbono y uno de nitrógeno. El nitrógeno, que cumple la función de puente, contiene un grupo metilo. Del tropano deriva la ecgonina ( $C_9H_{15}NO_3$ , ECG) que presenta un radical hidroxilo (OH) en el carbono 3 y un grupo carboxílico (COOH) en posición 2; siendo, por tanto, el 3-hidroxi-2-carboxi-tropano.

La ECG puede formar ésteres con los alcoholes mediante su radical carboxílico (derivado del ácido metanólico) y con los ácidos por medio del grupo OH presente en la molécula. El éster doble, producto de la reacción con alcohol metílico y ácido benzoico, es la COC (Figura 1.2). La unión éster es bastante lábil en presencia de tejidos vegetales o animales, lo que hace que el contenido de COC en las hojas de coca se vaya perdiendo con el tiempo. La desecación hace más lento el proceso, pero no lo suprime.



**Figura 1.2.** Estructura química de la COC.

La estructura cíclica de la ECG permite a la COC generar los isómeros geométricos *cis* y *trans*. Además, la presencia de cuatro átomos de carbono asimétricos o quirales en la molécula, generan estereoisómeros ópticos (enantiómeros). Éstos presentan las mismas propiedades físicas y químicas pero se diferencian en que desvían el plano de la luz polarizada en diferente dirección: uno hacia la derecha y se representa con la letra (D) o el signo (+) (isómero dextrógiro o forma dextro) y otro a la izquierda y se representa con la letra (L) o el signo (-) (isómero levógiro o forma levo). Una mezcla de ambos isómeros en proporciones iguales genera la llamada COC racémica que no tiene actividad óptica.

Los carbonos quirales que contienen las moléculas de COC compiten entre sí contrarrestando la actividad óptica de ésta. Por tanto, la actividad óptica de la COC, así como la de todos los alcaloides, se debe más al nitrógeno que a los carbonos quirales, pero tampoco se debe ignorar que estos producen algún efecto en la desviación de la luz polarizada.

La L-cocaína es el alcaloide más importante de las hojas de coca. Es un prisma monoclinico, incoloro, con un punto de fusión de 98°C, cristaliza a partir de etanol, es muy soluble en cloroformo, soluble en etanol, éter dietílico, sulfuro de carbono, benceno, aceite de oliva, trementina, acetona, ácido acético y petróleo; es muy poco soluble en agua fría, insoluble en glicerina y sus soluciones son alcalinas al papel de tornasol.



La COC es una base débil ( $pK_a$  de 8,6), con peso molecular de 303,35 g/mol, un alto porcentaje de unión a proteínas (aproximadamente 90%<sup>1</sup>) y un elevado volumen de distribución (1,96 a 2,7 L/Kg<sup>1</sup>).

## 1.2 FORMAS DE ABUSO

El conocimiento de las formas de abuso de la COC es de gran interés ya que condiciona la farmacocinética, la actividad farmacológica, la toxicidad y el grado de adicción de la droga. Fundamentalmente se distinguen las siguientes formas de abuso:

**Hojas de coca.** Su administración se realiza por vía oral.

**Pasta de coca.** También se denomina sulfato de COC, pasta base o simplemente pasta. Es el producto bruto, o no refinado, que resulta del primer proceso de extracción de la COC a partir de las hojas de coca. Se obtiene de la maceración de las hojas con ácido sulfúrico u otros productos químicos (alcalinos, solventes orgánicos, amoníaco, etc.). Contiene de un 40 a un 85% de sulfato de COC. Sirve de base para la posterior elaboración del clorhidrato de COC. Se administra por vía intrapulmonar (fumada).

**Clorhidrato de cocaína.** Es la sal de la COC, formada con ácido clorhídrico. Se presenta en forma de cristales escamosos blancos, más o menos adulterada. Se administra por vía intranasal (esnifada) o se inyecta por vía intravenosa. No se puede fumar pues se destruye por el calor. A veces se combina con heroína (HER) (*speedball*) para evitar los desagradables efectos rebote producidos por la COC.



**Figura 1.3.** Clorhidrato de COC.

**Cocaína base.** Se obtiene mezclando el clorhidrato de COC con una solución básica (amoníaco, hidróxido sódico o bicarbonato sódico), luego se filtra el precipitado o se disuelve con éter y se deja que éste se evapore. Existen dos formas de consumo: la primera consiste en inhalar los vapores de base libre (*free base*), extraída del clorhidrato con solventes volátiles (éter) a muy alta temperatura (800°C) utilizando mecheros de

propano. La complejidad del proceso (necesidad de pipa de agua, éter, mechero de propano) hace que su uso esté menos extendido. El *crack* es la segunda forma de consumo. Es una forma de COC base que se obtiene añadiendo amoníaco a una solución acuosa de clorhidrato de COC en presencia de bicarbonato sódico para alcalinizarla. La base precipita cuando se calienta la mezcla a 98°C. Una vez seca adquiere un aspecto de porcelana, se tritura en escamas, y se presenta habitualmente como gránulos de 125 a 300 mg (1 ó 2 dosis). El *crack* se inhala (vía intrapulmonar) en recipientes calentados o se fuma (vía intrapulmonar) pulverizado y mezclado con tabaco, marihuana, fenciclidina (PCP), etc., en forma de cigarrillos.

### 1.3 PREVALENCIA DE CONSUMO

Según datos del Observatorio Europeo sobre Drogas y Toxicomanías<sup>2</sup>, en comparación con el resto de países de la Unión Europea, España mostró el mayor porcentaje de consumo de COC en la población general en el grupo de edad de 15 a 64 años. En el grupo de edad de 15 a 35 años, España es también, junto con Reino Unido, el país con mayor prevalencia; y en el grupo de edad de 15 a 24 años, España ocupa un segundo puesto por detrás, nuevamente, de Reino Unido.

Actualmente la COC ocupa el segundo lugar entre las drogas ilegales que se consumen en España, después del cannabis, según el informe publicado por el Plan Nacional sobre Drogas en el 2009<sup>3</sup>.

Todos los indicadores manejados por el Observatorio Español sobre Drogas (OED) son consistentes a la hora de mostrar el aumento del consumo hasta 2004-2005. Por ejemplo, la prevalencia anual de consumo entre la población de 15 a 64 años pasó de 1,8% en 1995 a 2,7% en 2003 y 3,0% en 2005, la prevalencia anual entre los estudiantes de Enseñanzas Secundarias de 14 a 18 años de 1,8% en 1994, a 2,7% en 1996, 6,2% en 2002 y 7,2% en 2004, y el número de tratados por primera vez en la vida por COC de 932 en 1992 a 1892 en 1996, 5977 en 2001, 11851 en 2003 y 15258 en 2005. Por su parte, la proporción de urgencias hospitalarias, directamente relacionadas con drogas ilegales, en que se menciona consumo de COC, pasó de 26,1% en 1996 a 44,4% en 2001, 49,0% en 2002, 58,5% en 2004 y 63,4% en 2005, y la proporción de muertes por reacción aguda a drogas ilegales en que se detecta COC y no los opioides

pasó de 0-2% en la década de los ochenta a 3,9% en 1996, 6,1% en 2000, 16,4% en 2003 y 20,6% en 2005. Además, la oferta de COC durante el mismo período se mantuvo estabilizada o aumentó. De hecho, el indicador precio-pureza de los pequeños decomisos de esta droga se mantuvo bastante estable; sin embargo, su disponibilidad mostró un aumento sostenido tanto entre la población de 15 a 64 años, como entre los estudiantes de 14 a 18 años<sup>4</sup>.

Aunque es probable que en España esté aumentando el uso de COC fumada, las prevalencias de consumo que muestran las encuestas domiciliarias o escolares no son aún elevadas, por lo que es probable que su consumo permanezca en buena medida confinado en los círculos de los consumidores de HER. Además, aunque los problemas relacionados con el consumo de COC base han aumentado en los últimos años (de hecho, el número de primeros tratamientos por COC consumida preferentemente por vía pulmonar pasó de 139 en 1991 a 1284 en 2001, 1837 en 2004 y 1755 en 2005), lo han hecho a un ritmo mucho menor que la COC esnifada, y en 2005 la proporción que suponían los tratamientos por COC fumada sobre el total de tratamientos por COC era sólo de un 11,5%, y la proporción de urgencias relacionadas con COC fumada sobre el total de urgencias relacionadas con COC de un 22,7%, frente a un 80,6% y 55,4%, respectivamente, de los tratamientos y las urgencias relacionados con COC esnifada<sup>4</sup>.

## **1.4 FARMACOCINÉTICA**

La farmacocinética estudia los procesos de absorción de la droga, su distribución en los tejidos del organismo, su metabolismo y su excreción. La farmacocinética nos sirve para conocer la duración de la acción de una droga y la velocidad de su inactivación y eliminación<sup>5</sup>.

### **1.4.1 ABSORCIÓN Y CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS**

La absorción, los picos plasmáticos, la duración del efecto y la biodisponibilidad de la COC tras el consumo dependen de la vía utilizada (Tabla 1.1). El término absorción denota la rapidez con que la COC pasa desde su punto de administración hasta la circulación sanguínea. Así, la absorción a través de la mucosa nasal después de esnifar y la absorción a través del tracto digestivo después de su administración oral es similar y

mucho más lenta que después de fumar o después de la administración intravenosa. La vía de acción más rápida es la inhalada o fumada (vía intrapulmonar) ya que la COC se difunde muy rápidamente de pulmones a cerebro, sus efectos son inmediatos (3-5 segundos) y muy intensos (se dice que 10 veces superiores a la COC intravenosa o intranasal), sin embargo son muy fugaces (5-15 minutos), su “bajada” resulta tan insufrible que entraña un uso compulsivo y muy frecuente.

La biodisponibilidad de la COC, es decir, la cantidad de droga que llega en forma activa a la circulación, es de un 30% por vía oral; por vía intranasal varía de un 25 a un 94% (dependiendo de la dosis) y por vía intrapulmonar varía de un 60% a un 70% (dependiendo de si se fuma en pipa de maíz o en pipa de vidrio, respectivamente)<sup>1</sup>.

**Tabla 1.1.** Absorción, picos plasmáticos, duración del efecto y biodisponibilidad alcanzadas tras el consumo de COC<sup>1</sup>.

VÍA*	TIEMPO DE ACCIÓN	PICO DE EFECTO MÁXIMO	DURACIÓN DEL EFECTO	BIODISP (%)
<b>O</b>	5'	-	-	30
<b>IN</b>	-	15-20'	60-90'	25-94
<b>IV</b>	10-60"	3-5'	20-60'	-
<b>IP</b>	3-5"	1-3'	5-15'	60-70

\* O: oral, IN: intranasal, IV: intravenosa, IP: intrapulmonar.

Las concentraciones plasmáticas máximas alcanzadas después de las diferentes administraciones varían enormemente. No sólo dependen de las dosis y de las vías de administración, sino también de la frecuencia de uso. Las dosis de COC normalmente varían en un rango entre 1 y 25 g de polvo y entre 4 y 10 mL de solución (40 mg/mL y 100 mg/mL)<sup>1</sup>, sin embargo las concentraciones plasmáticas máximas varían en un rango entre 100 ng/mL y 2500 ng/ml (en los casos de muerte por COC)<sup>1</sup>.

### 1.4.2 DISTRIBUCIÓN

La distribución de la COC puede definirse, entre otras formas, como el transporte por la sangre hasta el lugar donde ejerce su acción. Algunos factores que afectan a la distribución de la COC en los tejidos son, el porcentaje de unión a proteínas y el volumen de distribución. Tal como se ha indicado en el apartado de Estructura Química y

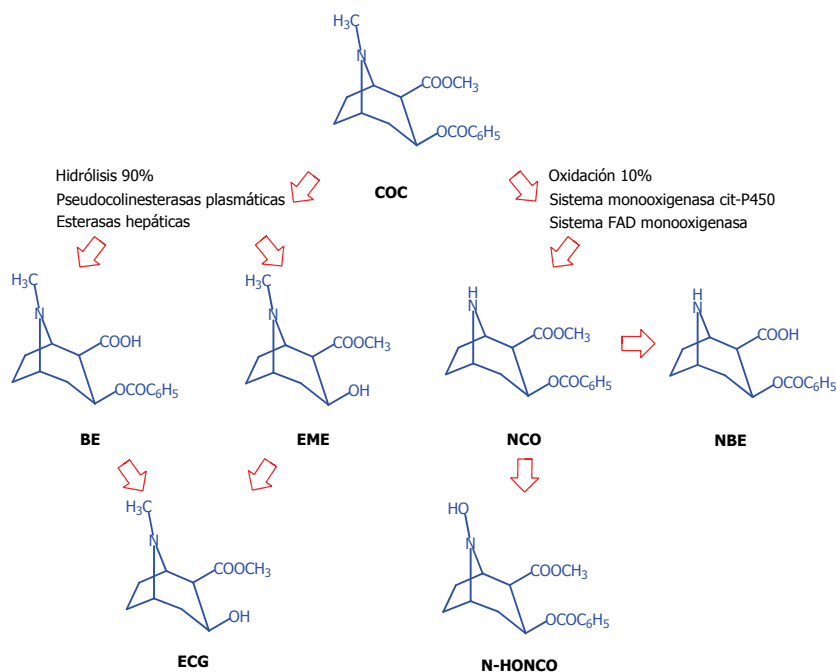
Propiedades, la COC presenta un alto porcentaje de unión a proteínas (aproximadamente 90%<sup>1</sup>), pero también un elevado volumen de distribución (1,96 a 2,7 L/Kg<sup>1</sup>).

El volumen de distribución (VD) se define como el hipotético volumen en el que se distribuye una droga en el organismo, y se calcula conociendo la cantidad total de droga absorbida y la concentración plasmática a tiempo cero. Se expresa en litro por kilogramo de peso corporal (L/Kg). Las drogas que no se distribuyen por los tejidos o por el espacio extracelular tienen un VD de entre 0,05 L/Kg y 0,2 L/Kg. El contenido total de agua en el organismo es de 0,5 L/Kg, por lo que valores de VD > 0,5 L/Kg son elevados e implican altos valores relacionados con una alta afinidad de la droga por acumularse en los tejidos, como ocurre en el caso de la COC.

### 1.4.3 METABOLISMO

Las vías del metabolismo de la COC se muestran a grandes rasgos en la Figura 1.4. La principal vía de transformación de la COC es la hidrolítica. En humanos, un 90% de la COC se metaboliza por hidrólisis y se excreta por la orina en forma de benzoilecgonina (BE) y ecgonina metil éster (EME). Las esterasas plasmáticas y hepáticas son las responsables de la formación del éster metílico de la ecgonina. Las pequeñas cantidades de ECG encontradas en la orina humana parecen derivar de la hidrólisis de la BE y quizás de la hidrólisis no enzimática de la EME<sup>6,7</sup>.

Ninguno de los metabolitos derivados de la hidrólisis de la COC (BE, EME y ECG) son hepatotóxicos cuando se administraron a ratones en dosis elevadas. Se ha observado que la inhibición de esta vía hidrolítica con diazinon, produce una marcada elevación de la hepatotoxicidad de la COC en el ratón<sup>8</sup>, lo que confirma que el metabolismo hidrolítico de la COC es una vía de destoxificación.

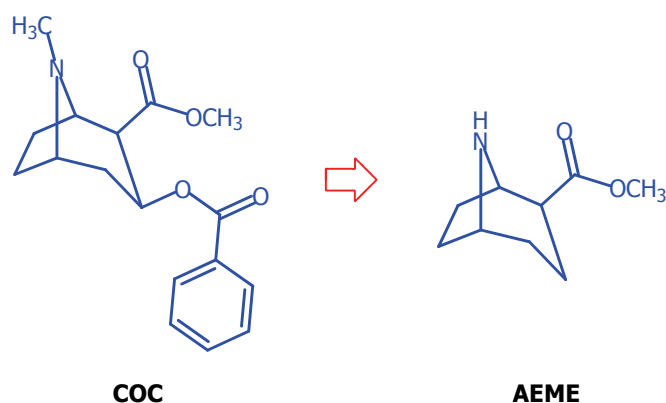


**Figura 1.4.** Metabolismo oxidativo y no oxidativo de la COC.

En humanos en condiciones normales, un 10% de la COC administrada sufre la oxidación del nitrógeno del tropano, catalizada por sistemas enzimáticos ubicados en los microsomas hepáticos. En la oxidación secuencial de la COC, el primer paso es la desmetilación de la COC a norcocaína (NCO). La NCO puede derivar directamente de la COC, vía citocromo P-450 o a través de la formación de un derivado N-óxido, catalizada por la flavina adenina dinucleótido (FAD) monooxigenasa, con la subsiguiente oxidación a NCO mediada por el citocromo P-450<sup>9</sup>. El grado de contribución de la N-desmetilación al metabolismo total de la COC varía entre las especies. Se ha estimado en un 45% en ratón, un 20% en rata y un 10% en humanos<sup>7,10</sup>. La NCO, al ser administrada a ratones, presenta un potencial hepatotóxico similar a la COC<sup>11</sup>, pero el tratamiento con inhibidores del P-450 impide el desarrollo de la lesión hepática, lo que indica que la NCO necesita ser oxidada para llegar a la especie hepatotóxica. El siguiente paso es la N-hidroxilación de la NCO a N-hidroxinorcocaína (N-HONCO), mediada por el citocromo P-450/FAD monooxigenasa<sup>12</sup>. La N-HONCO, al ser administrada directamente en animales, se observó que posee mayor potencial hepatotóxico que la COC y la NCO<sup>8</sup>, pero aún así su

hepatotoxicidad se bloquea por tratamiento con SKF-525A, lo cual muestra que se necesita una oxidación adicional para llegar al verdadero hepatotóxico. La posterior oxidación de la N-HONCO conduce al radical NCO nitróxido. Charkoudian y Shuster<sup>13</sup> han observado que una posterior oxidación electroquímica de la NCO a nitróxido conduce a la formación de un ión NCO nitrosinio reactivo. Se ha demostrado que la N-HONCO y la NCO nitróxido poseen capacidad para estimular la peroxidación lipídica, siendo la NCO nitróxido la más efectiva en la iniciación de este proceso.

Cuando la COC se fuma, la droga se piroliza a una serie de compuestos químicos dependiendo de la temperatura. El principal metabolito es la anhidroecgonina metil éster (AEME), también conocida como metil ecgonidina (Figura 1.5). La AEME es farmacológicamente activa en animales, sin embargo en humanos existen muy pocos trabajos y no se conoce con exactitud su perfil farmacológico (podría tener efectos inotrópicos negativos).



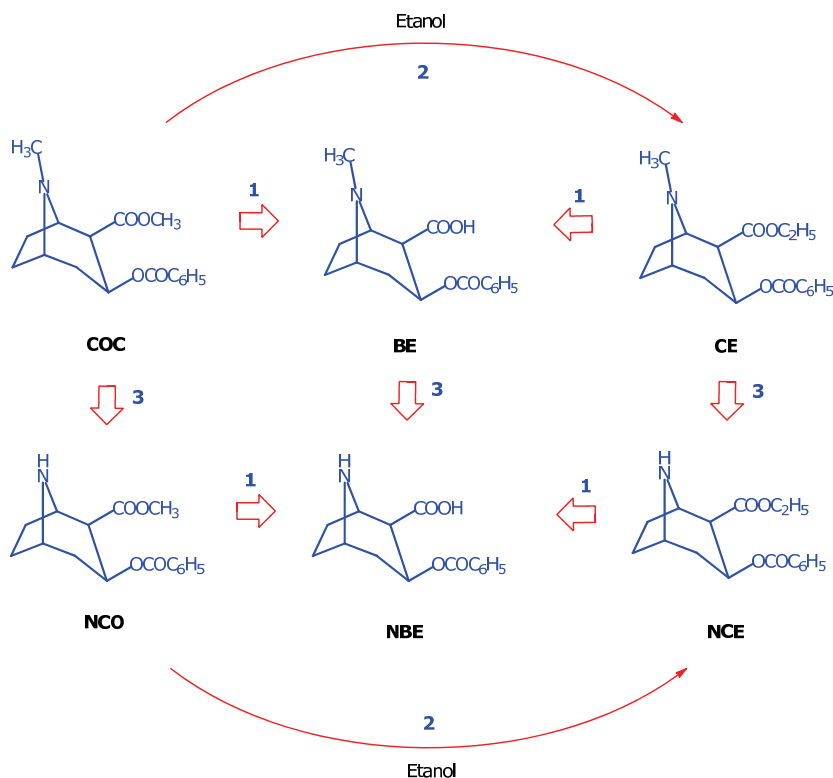
**Figura 1.5.** Pirólisis de la COC.

El consumo concomitante de COC y alcohol étílico origina la formación de un metabolito, el cocaetileno (CE), que presenta una hepatotoxicidad mayor que la COC<sup>14,15,16</sup>.

El metabolismo de la COC y el etanol implica tres clases de reacciones: hidrólisis, transesterificación y N-desmetilación (Figura 1.6). La hidrólisis de la COC y el CE a BE está catalizada por una carboxilesterasa presente en el hígado humano<sup>17</sup>. La NCO y el norcocaetileno (NCE) son sustratos del mismo enzima y pueden originar norbenzoilecgonina (NBE). El etanol inhibe las reacciones hidrolíticas de la carboxilesterasa e induce simultáneamente la transesterificación etílica de la COC con formación del CE<sup>17</sup>. El etanol puede también inducir la transesterificación etílica de la NCO a NCE. La N-desmetilación de la COC a NCO está catalizada, bien directamente, por un enzima dependiente del citocromo P-450, o después de la oxidación de la COC, a su derivado N-óxido, por una FAD monooxigenasa<sup>9</sup>. La N-desmetilación de la BE a NBE ha sido demostrada en ratas<sup>18</sup>.

La transesterificación de la COC a CE está catalizada por una carboxilesterasa inespecífica, la carboxilesterasa hepática<sup>19</sup>. La misma enzima hepática cataliza la hidrólisis de la COC a BE, metabolito sin actividad estimulante psicomotora. Esta esterasa se inhibe por etanol, de manera que este suprime la inactivación de la COC en su conversión a BE y cataliza la transesterificación etílica con la COC para formar el CE, metabolito farmacológicamente activo. Esta desviación en el metabolismo de la COC, inducido por el etanol puede explicar el porqué la ingestión de etanol incrementa la toxicidad de la COC<sup>17</sup>.





**Figura 1.6.** Metabolismo de la COC en presencia de etanol. Implica tres clases de reacciones: hidrólisis, transesterificación y N-desmetilación. (1) Carboxilesterasa hepática inhibida por el etanol. (2) Transesterificación inducida por el etanol. (3) N-desmetilación por un enzima dependiente del citp450 directamente o después de la oxidación de la COC a su derivado N-óxido catalizada por una FAD-monooxigenasa.

#### 1.4.4 EXCRECIÓN

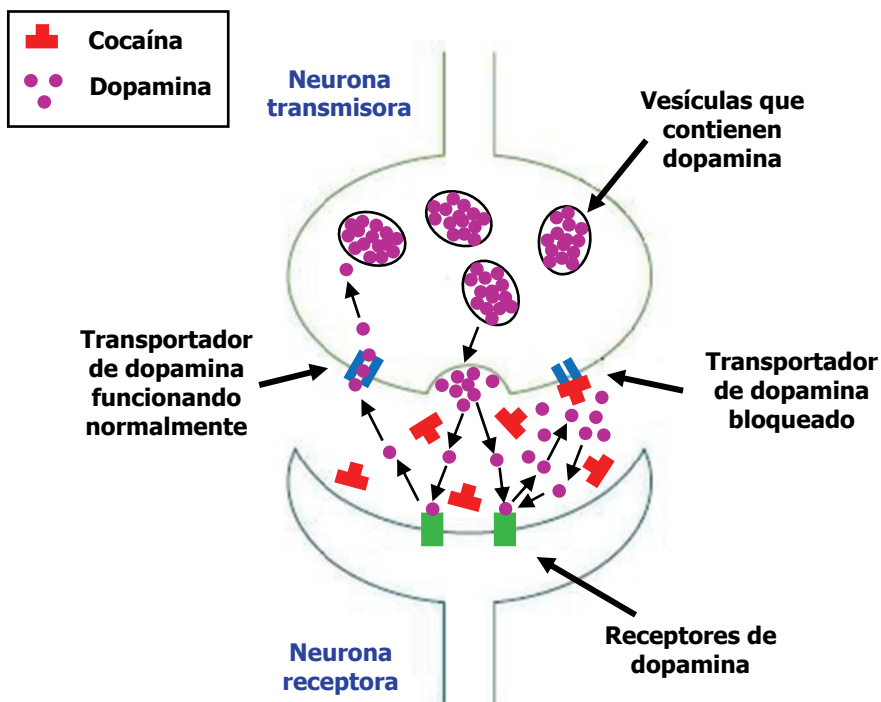
La excreción de la COC se produce principalmente por vía renal, siendo eliminada de forma inalterada entre el 1 y el 5% de la droga. El pH de la orina influye de forma importante en el porcentaje de droga que se elimina de manera inalterada. La COC es una sustancia básica por lo que a pH ácido será hidrosoluble, lo que favorece su eliminación en la orina, y a pH básico será liposoluble, lo que dificulta su eliminación y favorece su reabsorción a nivel renal. De esto se deduce que en orinas de pH ácido aparecerá un alto porcentaje de droga en forma inalterada, y que en orinas de pH básico

el porcentaje de droga inalterada será más bajo, ya que en estas condiciones la eliminación será mucho más lenta, por lo que podrían tener lugar las reacciones de metabolización en mucha mayor cuantía, y consecuentemente la cantidad de droga inalterada en la orina será menor. El pH urinario depende de la dieta y del consumo de otras drogas, incluso algunos consumidores modifican el pH de la orina haciéndolo básico mediante la ingesta de, por ejemplo, bicarbonato, en un intento de prolongar los efectos de esta sustancia.

El aclaramiento de la COC varía entre 20 y 30 ml/min/Kg<sup>20</sup>. La vida media,  $t_{1/2}$  (tiempo que tarda el organismo en eliminar del plasma la mitad de la droga absorbida) es variable dependiendo de la vía de administración. Por vía intravenosa  $t_{1/2} = 37-41$  min, fumada  $t_{1/2} = 58-89$  min y por vía intranasal  $t_{1/2} = 73-207$  min<sup>1</sup>. La BE presenta una vida media por las tres rutas que varía de 3,55 a 5,79 horas<sup>1</sup> y la EME de 3 a 8 horas<sup>20</sup>.

## **1.5 MECANISMO DE ACCIÓN**

La COC se comporta como una amina simpaticomimética de acción indirecta, es decir, es capaz de simular las acciones de las catecolaminas no actuando directamente sobre los receptores adrenérgicos o dopaminérgicos, sino aumentando la disponibilidad del neurotransmisor en la hendidura sináptica. La COC es un inhibidor de los procesos de recaptación tipo I (recaptación de noradrenalina y dopamina desde la hendidura sináptica a la terminal presináptica; Figura 1.7) lo que facilita la acumulación de noradrenalina o dopamina en la hendidura sináptica<sup>20</sup>.



**Figura 1.7.** Mecanismo de acción de la COC.

El aumento de la biodisponibilidad de dopamina, por la inhibición de la recaptación tipo I, media la euforia que produce la COC, y parece que está implicada en el mecanismo de adicción. El consumo crónico de COC también produce cambios en la disponibilidad de la dopamina. En los últimos años se ha implicado al transportador de la recaptación de dopamina, no sólo en las acciones conductuales, sino también en las acciones bioquímicas de la COC. El transportador de la recaptación de dopamina controla los niveles de este neurotransmisor a nivel de la hendidura sináptica ya que incorpora rápidamente a la terminal presináptica la dopamina liberada. En estudios realizados con ratones genéticamente deficientes en este transportador, la administración de COC no produce efectos conductuales ni bioquímicos, por tanto, parece que dicho transportador es necesario para la acción farmacológica de la COC, ya que al bloquearlo, uniéndose de manera específica y con gran afinidad, inhibiría la recaptación dopaminérgica<sup>20</sup>.

El exceso de noradrenalina que se produce por acción de la COC es el responsable de la mayoría de los efectos farmacológicos y de las complicaciones agudas derivadas del consumo de COC (aumento de presión arterial, dilatación pupilar, sudoración, temblor etc.)<sup>20</sup>.

La COC también bloquea la recaptación de serotonina, y el consumo crónico de esta sustancia produce cambios en estos neurotransmisores, con una disminución de la biodisponibilidad, que se refleja en la disminución de los metabolitos 3-metoxi-4-hidroxifenetilenglicol y ácido 5-hidroxiindolacético. Estos efectos sobre la neurotransmisión catecolaminérgica y serotoninérgica constituyen, así mismo, la base de su mecanismo de acción como droga creadora de dependencia<sup>20</sup>.

Por otra parte, es conocido que la COC fue el primer anestésico local utilizado en clínica. Desde entonces, se han sintetizado un número importante de estos agentes, el primero de los cuales fue la procaína (novocaína) en 1905. La COC comparte con todos estos compuestos el mecanismo de acción anestésica local: disminución de la permeabilidad de la membrana a los iones sodio, lo que produce un bloqueo de la conducción nerviosa<sup>20</sup>.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Leikin J, Paloucek F. Poisoning and Toxicology Handbook. Nueva York, CRC Press, 2008, 213.
2. Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías. El problema de la drogodependencia en Europa. Informe anual 2009. Luxemburgo, 2009.
3. Gobierno de España, Ministerio de Sanidad y Política Social. Estrategia Nacional sobre drogas 2009-2016. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas, 2009.
4. Observatorio Español sobre Drogas (OED). Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas (DGPNSD). Informe 2007. Situación y tendencias de los problemas de drogas en España.
5. Drummer OH, Odell M. The forensic pharmacology of drugs of abuse. Londres, Arnold, 2001.
6. Steward DJ, Inaba T, Lucassen M, Kalow W. Cocaine metabolism: cocaine and norcocaine hydrolysis by liver and serum esterases. Clin Pharmacol Ther 25(4) (1979) 464-468.
7. Roberts SM, Roth L, Harbison RD, James RC. Cocaethylene hepatotoxicity in mice. Biochem Pharmacol 43(9) (1992) 1898-1995.
8. Evans MA. Role of protein binding in cocaine-induced hepatic necrosis. J Pharm Exp Ther 224(1) (1983) 73-79.
9. Kloss MW, Rosen GM, Rauckman EJ. Cocaine-mediated hepatotoxicity. A critical review. Biochem Pharmacol 33(2) (1984) 169-173.
10. Inaba T, Stewart DJ, Kalow W. Metabolism of cocaine in man. Clin Pharmacol Ther 23(5) (1978) 547-552.
11. Freeman RW, Harbison RD. Hepatic periportal necrosis induced by chronic administration of cocaine. Biochem Pharmacol 30(7) (1981) 777-783.
12. Shuster L, Casey E, Welankiwar SS. Metabolism of cocaine and norcocaine to N-hydroxynorcocaine. Biochem Pharmacol 32(20) (1983) 3045-3051.
13. Charkoudian JC, Shuster L. Electrochemistry of norcocaine nitroxide and related compounds: implications for cocaine hepatotoxicity. Biochem Biophys Res Commun 130(3) (1985) 1044-1051.

14. Boyer CS, Petersen DR. Hepatic biochemical changes as a result of acute cocaine administration in the mouse. *Hepatology* 14(6) (1991) 1209-1216.
15. Hearn WL, Rose S, Wagner J, Ciarleglio A, Mash DC. Cocaethylene is more potent than cocaine in mediating lethality. *Pharmacol Biochem Behav* 39(2) (1991) 531-533.
16. Katz JL, Terry P, Witkin JM. Comparative behavioral pharmacology and toxicology of cocaine and its ethanol-derived metabolite, cocaine ethyl-ester (cocaethylene). *Life Sci* 50(18) (1992) 1351-1361.
17. Dean RA, Christian CD, Sample RH, Bosron WF. Human liver cocaine esterases: ethanol mediated formation of ethylcocaine. *FASEB J* 5(12) (1991) 2735-2739.
18. Misra AL, Nayak PK, Bloch R, Mulé SJ. Estimation and disposition of [3H] benzoylecgonine and pharmacological activity of some cocaine metabolites. *J Pharm Pharmacol* 27(10) (1975) 784-786.
19. Boyer CS, Petersen DR. Enzymatic basis for the transesterification of cocaine in the presence of ethanol: evidence for participation of microsomal carboxylesterases. *J Pharmacol Exp Ther* 260(3) (1992) 939-946.
20. Lizasoain I, Moro MA, Lorenzo P. Cocaína: aspectos farmacológicos. *Adiciones* 14(1) (2002) 57-64.



Capítulo

2

**Introducción:**  
**Opioides**





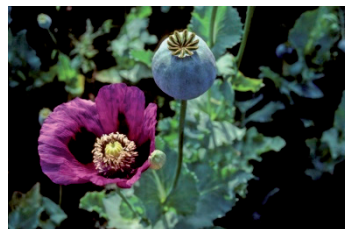
## Capítulo 2. Introducción: Opioides

<b>2.1</b>	OPIOIDES EN ESTUDIO.....	25
<b>2.2</b>	ESTRUCTURA QUÍMICA Y PROPIEDADES .....	25
<b>2.3</b>	FORMAS DE USO.....	28
<b>2.3.1</b>	USO CLÍNICO .....	28
<b>2.3.2</b>	USOS ILÍCITOS.....	28
<b>2.3.2.1</b>	MORFINA .....	28
<b>2.3.2.2</b>	HEROÍNA .....	29
<b>2.4</b>	PREVALENCIA DE CONSUMO .....	30
<b>2.5</b>	FARMACOCINÉTICA .....	31
<b>2.5.1</b>	ABSORCIÓN.....	31
<b>2.5.2</b>	DISTRIBUCIÓN .....	32
<b>2.5.3</b>	METABOLISMO .....	33
<b>2.5.3.1</b>	MORFINA .....	33
<b>2.5.3.2</b>	CODEÍNA.....	34
<b>2.5.3.3</b>	HEROÍNA .....	35
<b>2.5.4</b>	EXCRECIÓN .....	36
<b>2.6</b>	MECANISMO DE ACCIÓN .....	37
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39



## 2.1 OPIOIDES EN ESTUDIO

La morfina (MOR) y la codeína (COD) son opioides naturales que se encuentran en el zumo de las semillas de la adormidera o *Papaver somniferum* (Figura 2.1). El zumo seco y fermentado se denomina opio, y contiene una mezcla de alcaloides-opiáceos (MOR, COD, tebaína, papaverina, noscapina, etc.). El opio puro contiene entre un 10 y un 17% de MOR y entre un 1 y un 4% de COD<sup>1</sup>.

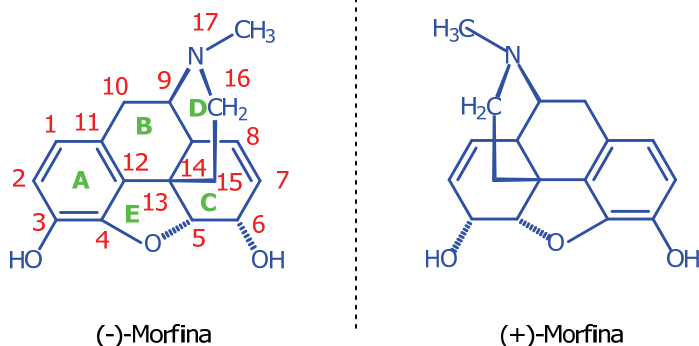


**Figura 2.1.** *Papaver somniferum*.

La HER es un opioide semisintético que se sintetiza a partir de la MOR. Fue sintetizada por primera vez en 1874 por Heinrich Dreser tratando de buscar un fármaco con la potencia analgésica de la MOR pero sin su capacidad adictiva, aunque pronto se comprobó que sus riesgos y efectos negativos eran superiores a los de la MOR.

## 2.2 ESTRUCTURA QUÍMICA Y PROPIEDADES

La estructura pentacíclica de la MOR (el opioide arquetípico) está constituida por un anillo bencénico (A), dos anillos ciclohexánicos parcialmente saturados (B y C), un anillo de piperidina (D) y uno de dihidrofurano (E) (Figura 2.2). Los anillos A, B y C forman un sistema fenantreno muy común en la naturaleza. Por otro lado, la estructura presenta dos grupos hidroxilo, uno fenólico en posición 3 y otro alílico en posición 6 y un enlace de tipo éter en las posiciones 4 y 5. Otra característica estructural importante viene determinada por la presencia de un grupo amino terciario en la posición 17. Debido a la poca flexibilidad conformacional del anillo de fenantreno, así como por los 5 centros quirales presentes (en posiciones 5, 6, 9, 13 y 14), la molécula de MOR posee un alto grado de estereoselectividad en su acción analgésica, de modo que exclusivamente el isómero natural (-)-5(R),6(S),9(R),13(S),14(R)-morfina posee actividad analgésica<sup>2</sup>.



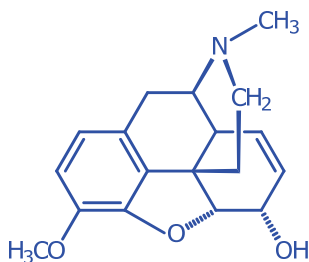
**Figura 2.2.** Estructura química de los isómeros de la MOR.

Como hemos visto, la molécula de MOR contiene un grupo fenol relativamente ácido ( $pK_a = 8,2$ ) y un grupo amino terciario básico. Sin embargo, debido a que el grupo amino es más básico de lo que el grupo fenol es ácido, se puede considerar una molécula básica desde el punto de vista farmacéutico y fisiológico. Así, la MOR existe en forma de catión a valores de pH fisiológicos y forma fácilmente sales solubles con ácidos (de ahí que en la mayoría de los preparados se encuentre en forma de sulfato o clorhidrato)<sup>2</sup>.

Los derivados de la MOR se pueden clasificar en tres grandes grupos, atendiendo a la naturaleza de su interacción frente a determinados receptores de narcóticos (Ver apartado Mecanismo de Acción). Así, existen derivados agonistas, que pueden ser naturales (alcaloides derivados del opio, MOR, COD, etc.), semisintéticos (hidromorfona, oximorfona, oxycodona, etc.) o sintéticos (meperidina, levorfanol, metadona, sufentanil, alfentanil, fentanil, etc.). También hay derivados con una acción mixta agonista-antagonista (nalbuphina, pentazocina, etc.) que se caracterizan por tener una actividad agonista en ciertos receptores y antagonistas en otros, y derivados antagonistas simplemente. Estos últimos se caracterizan porque no tienen una actividad agonista en los receptores opiáceos y normalmente los bloquean, inhibiendo los efectos de los agonistas y por ello se utilizan en el tratamiento de trastornos de dependencia<sup>2</sup>.

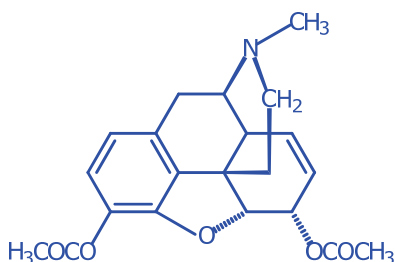
Se han llevado a cabo numerosas modificaciones sobre las distintas partes de la estructura de la MOR, principalmente mediante la funcionalización del grupo 3-hidroxilo, el cual posee una importancia clave en lo referente a su actividad analgésica<sup>2</sup>. Así, la

eterificación de dicho grupo reduce su capacidad analgésica, tanto más cuanto mayor es la longitud del grupo éter introducido. La introducción de un grupo metilo da lugar a la COD (Figura 2.3). Este derivado resulta ser un antitusivo muy útil, pese a su limitada actividad analgésica<sup>2</sup>.



**Figura 2.3.** Estructura química de la COD.

Cuando se acetilan los dos grupos hidroxilo de la posiciones 3 y 6 se obtiene la HER (Figura 2.4), cuya elevada lipofilia incrementa su entrada en el sistema nervioso central (SNC)<sup>2</sup>.



**Figura 2.4.** Estructura química de la HER.

De forma general podemos concluir que los opioides en estudio son sólidos blancos de sabor amargo y cristalizables, de carácter básico (pka próximos a 8), lipófilos, con pesos moleculares alrededor de 300 g/mol (286 g/mol para la MOR, 300 g/mol para la COD y 369 g/mol para la HER), con porcentajes de unión a proteínas bajos (35% para la MOR, 7% para la COD y 40% para la HER)<sup>3</sup> y un elevado volumen de distribución (3-4 L/Kg para la MOR y 25 L/kg para la HER)<sup>3</sup>.

## **2.3 FORMAS DE USO**

### **2.3.1 USO CLÍNICO**

Las principales indicaciones terapéuticas de los opioides en estudio son: dolor agudo y crónico, tos, edema agudo de pulmón, disnea de enfermos terminales, analgesia durante anestesia, desintoxicación de opioides y prevención de recaídas de opioides.

Para cada cuadro clínico deberá seleccionarse el fármaco más eficaz y la vía de administración más pertinente.

Las vías parenterales se utilizan en cuadros agudos graves, especialmente en el dolor de intensidad severa. Las vías intramuscular y subcutánea son adecuadas en la mayoría de estos casos. La vía intravenosa se reserva para emergencias o para la instauración de bombas de infusión o de bombas de analgesia controlada por el paciente. En el tratamiento del dolor neoplásico y en unidades de cuidados paliativos, se emplean bombas de infusión subcutánea. La vía oral es de elección en el caso de dolor agudo leve-moderado (COD, tramadol) o cuando el tratamiento debe prolongarse (dolor severo neoplásico utilizando MOR oral). La vía bucal, sublingual y transdérmica se emplean fundamentalmente para el tratamiento del dolor crónico. Además, la vía sublingual se utiliza en el tratamiento de mantenimiento de la dependencia.

### **2.3.2 USOS ILÍCITOS**

#### **2.3.2.1 MORFINA**

En el mercado clandestino la MOR se vende en forma de polvo en paquetes, igual que la HER.

La vía más común de administración de la MOR ilícita es la fumada. Para fumar la MOR (*Chandoo*), esta requiere una manipulación que pasaría por secar el producto, disolverlo y someterlo a un proceso de fermentación durante aproximadamente un año con el hongo *Aspergillus niger*.

También puede ingerirse sin transformarse en *Chandoo*, tal como ocurre en los países musulmanes. E incluso, a veces se llega a comer directamente la planta, como es el caso del kenaar persa.

### 2.3.2.2 HEROÍNA

La HER puede utilizarse en una amplia variedad de formas, dependiendo de la preferencia del usuario y la pureza de la droga. Fundamentalmente se distinguen las siguientes formas de abuso:

**Heroína esnifada.** Consiste en la administración de la HER en polvo por vía intranasal.

**Heroína inyectada.** Sobre una cuchara se coloca la HER en polvo y se mezcla con agua y un poco de ácido cítrico (zumo limón) y se pone encima de una fuente de calor con el fin de facilitar la disolución. Encima de la mezcla resultante, se coloca un trozo de algodón o el filtro de un cigarrillo, destinado a cribar las impurezas, antes de ser introducida en la jeringuilla e inyectada directamente en la vena (vía intravenosa) o el músculo (vía intramuscular).



**Figura 2.5.** HER inyectada.

**Heroína fumada.** Se denomina comúnmente *chino de heroína*. Se administra por vía intrapulmonar mezclada con tabaco o marihuana.

**Heroína inhalada.** La HER se calienta sobre un papel de aluminio y se inhalan los vapores que desprende (vía intrapulmonar).



**Figura 2.6.** HER inhalada.

Durante mucho tiempo, la HER se ha consumido preferentemente por vía intravenosa. La aparición del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y su devastadora irrupción entre los heroinómanos y la disponibilidad de una HER de mayor pureza (que es más apta para la inhalación) explica que la tendencia actual en los adictos noveles sea la de fumar o aspirar el vapor del calentamiento de la sustancia.

## **2.4 PREVALENCIA DE CONSUMO**

A nivel europeo, España presenta un porcentaje alto de consumo de HER en el grupo de edad de 15 a 64 años, después de Austria, Italia y Malta<sup>4</sup>.

Según el último informe del 2007 publicado por el OED<sup>5</sup>, aunque históricamente en España la HER ha sido responsable de la mayoría de los problemas graves relacionados con las drogas ilegales, en los últimos años tanto el consumo como los problemas asociados a esta droga han disminuido de forma importante. Hasta 2004 todos los indicadores manejados por el OED (indicadores de control de la oferta, encuestas domiciliarias y escolares, estimaciones del consumo problemático, tratamientos, urgencias o muertes relacionados con el consumo de HER) mostraban una tendencia descendente. Por ejemplo, el número de personas tratadas por primera vez por abuso o dependencia de HER pasó de 20017 en 1992 a 16647 en 1996, 7461 en 2001 y 3836 en 2004; la proporción de urgencias hospitalarias directamente relacionadas con drogas, en que se menciona consumo de HER pasó de 61,5% en 1996 a 40,5% en 2000 y 24,2% en 2004; y el número de muertes por reacción aguda a drogas con presencia de opioides en seis grandes ciudades, pasó de 544 en 1992 a 391 en 1996, 225 en 2003 y 183 en 2004. Sin embargo, a partir de 2004 se ha notado un aumento de la prevalencia de consumo de HER alguna vez en la vida entre los estudiantes de 14 a 18 años (0,5% en 1994, 0,7% en 2004 y 1% en 2006), una ralentización del descenso del número de primeras admisiones a tratamiento por abuso o dependencia de HER (3836 en 2004 y 3604 en 2005), una estabilización de la edad media de admisión a tratamiento y un descenso de la edad media de inicio en el consumo entre los admitidos a tratamiento por primera vez, y una estabilización de las urgencias hospitalarias directamente relacionadas con drogas en que se menciona consumo de HER (24,2% en 2004 y 24,8% en 2005) y de la presencia de opioides en las muertes directamente relacionadas con drogas en seis



grandes ciudades (183 en 2004 y 185 en 2005). Igualmente, a partir de 2003 se observa un descenso de la relación precio-pureza de los pequeños decomisos de HER, lo que se interpreta como un aumento de la oferta de HER. Por otra parte, continúa descendiendo el uso de la vía parenteral en el consumo de HER, de hecho, la proporción de pacientes tratados por HER por primera vez en la vida, que consume esta droga principalmente por vía parenteral, pasó de 50,3% en 1991 a 18,2% en 2002, 16,4% en 2004 y 15,1% en 2005. Esta vía de administración ha sido sustituida principalmente por la vía intrapulmonar (*chino*). En 2005, sólo cuatro comunidades autónomas (Navarra, Aragón, Cantabria y Cataluña) estaban por encima del 25% en cuanto a la proporción de admitidos a tratamiento por primera vez que usaban preferentemente la HER por vía parenteral.

## 2.5 FARMACOCINÉTICA

### 2.5.1 ABSORCIÓN

En general, los opioides se absorben con facilidad por el tubo digestivo y es suficiente la absorción por la mucosa rectal. Los opioides lipófilos se absorben con facilidad a través de las mucosas nasal y bucal. Los opioides se absorben con facilidad después de la inyección subcutánea o intramuscular, y pueden penetrar lo suficiente en la médula espinal después de la administración epidural o intrarraquídea<sup>6</sup>.

Con la mayor parte de los opioides, entre ellos la MOR, el efecto de una dosis determinada es menor después de la administración oral que después de la parenteral, a causa del metabolismo variable, pero importante, de primer paso en el hígado<sup>6</sup>.

Cuando se administran MOR y la mayor parte de los opioides por vía intravenosa, éstos actúan de inmediato. Sin embargo, los compuestos más liposolubles (como la HER) lo hacen con mayor rapidez que la MOR después de la administración subcutánea, a causa de las diferencias en las velocidades de absorción y de entrada en el SNC. Cuando se administran opioides como la MOR, las duraciones de su acción analgésica manifiestan relativamente pocas variaciones. Otros efectos pueden persistir por más tiempo que la analgesia, y algunos fármacos tienden a acumularse tras la administración repetida<sup>6</sup>.

La absorción, los picos plasmáticos, la duración del efecto y la biodisponibilidad tras la administración de dosis similares de MOR, COD y HER a través de las distintas vías se muestran en la Tabla 2.1.

**Tabla 2.1.** Absorción, picos plasmáticos, duración del efecto y biodisponibilidad alcanzadas tras el consumo de MOR, COD y HER<sup>1,3,7,8</sup>.

OPIOIDE	VÍA*	TIEMPO DE ACCIÓN	PICO DE EFECTO MÁXIMO	DURACIÓN DEL EFECTO	BIODISP (%)
MOR	O	30'	1h	4-5h	25
	RC		20-60'	3-7h	
	SC		50-90'	4-5h	
	IM		30-60'	4-5h	
	IV	5-10'	20'	4-5h	30
COD	O	0.5-1h	1-1.5h	4-6h	50
	IM	10-30'	0.5-1h	4-6h	
HER	O		-	3-6h	20-50
	IN		5'		80
	IV		10'		
	IM		4-5'	3-6h	
	IP	I	2-15'		40-50
		FM	2-15'		90

\* O: oral, RC: rectal, SC: subcutánea, IM: intramuscular, IV: intravenosa, IP: intrapulmonar, I: inhalada, FM: fumada

## 2.5.2 DISTRIBUCIÓN

Entre el plasma sanguíneo y el líquido cefalorraquídeo hay una capa de células que actúan como una barrera hematoencefálica. Las moléculas más simples y las sustancias lipófilas alcanzan con facilidad el SNC a través de la sangre. Las sustancias hidrófilas y las unidas a proteínas tienen el paso disminuido por vía hematoencefálica<sup>1</sup>.

El porcentaje de unión a proteínas de la COD es bajo 7%<sup>3</sup>, sin embargo para la MOR y la HER el porcentaje es elevado, 35 y 40%<sup>3</sup>, respectivamente. Los volúmenes de distribución son de 25 L/kg<sup>3</sup> para la HER y 3-4 L/kg<sup>3</sup> para la MOR. El alto volumen de distribución de la HER, en comparación con el de la MOR, se debe a su mayor lipofilidad que le confieren sus dos grupos acetilos, por lo que pasa con mayor rapidez y facilidad a través de la barrera hematoencefálica. Aunque la HER se biotransforma totalmente al cabo de 20 minutos en MOR, alcanza el cerebro rápidamente<sup>1</sup>.

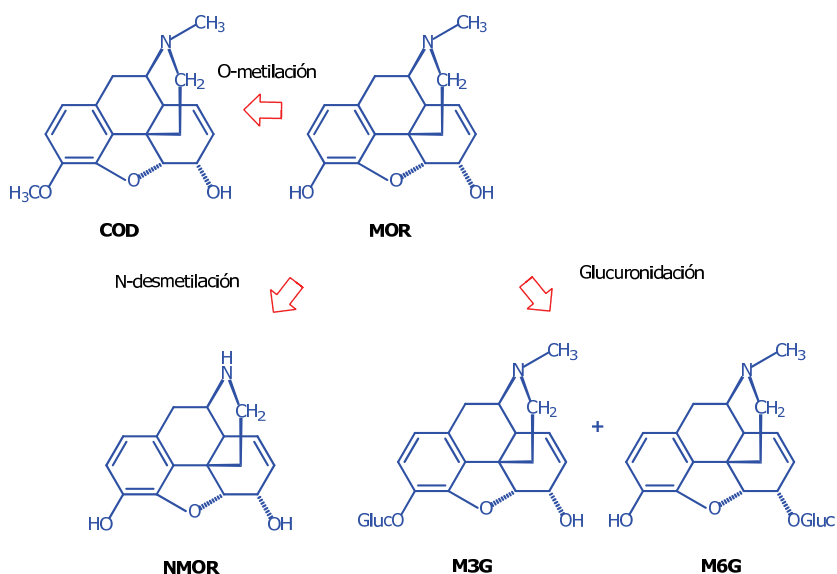
El paso de la MOR por la barrera hematoencefálica se ralentiza por su mala solubilidad en los lípidos. Esta barrera está tan sólo ligeramente desarrollada en los neonatos y, por lo tanto, puede alcanzar niveles tóxicos<sup>1</sup>.

Tanto la HER como su metabolito 6-monoacetilmorfina (6-MAM) son más liposolubles que la MOR y entran con mayor facilidad en el encéfalo. Las pruebas con que se cuenta sugieren que la MOR y la 6-MAM son la causa de las acciones farmacológicas de la HER<sup>6</sup>.

## 2.5.3 METABOLISMO

### 2.5.3.1 MORFINA

La vía principal del metabolismo de la MOR se lleva a cabo a nivel hepático a través de la conjugación con el ácido glucurónico para formar productos tanto activos como inactivos (Figura 2.7). Mediante esta vía se obtienen dos glucurónidos, la morfina 3-glucurónido (M3G, glucurónido mayoritario) y la morfina 6-glucurónido (M6G, glucurónido minoritario, 10%). Otras vías de metabolismo minoritarias son la O-metilación a COD y la N-desmetilación a normorfina (NMOR).



**Figura 2.7.** Metabolismo de la MOR.

Se ha demostrado que la modificación de la posición 3-hidroxi de la MOR disminuye la actividad analgésica, mientras que las modificaciones en la posición 6-hidroxi pueden, por el contrario, aumentar la actividad analgésica<sup>9</sup>.

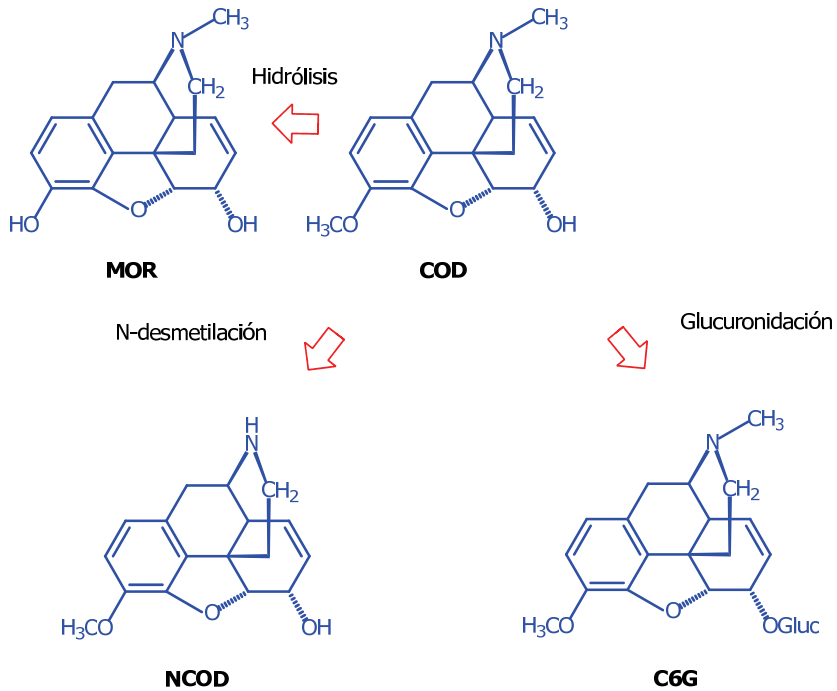
Por lo tanto, la M3G no tiene afinidad por los receptores opioides y no participa en la actividad analgésica de la MOR. Por otro lado, la M6G tiene una fuerte afinidad por los receptores opioides y se ha demostrado que tiene un efecto analgésico tanto en los roedores como en el hombre.

Se ha descrito la M6G como un analgésico más potente que la propia MOR tras una administración central<sup>10</sup> y con la misma actividad por vía sistémica. Estudios de unión ligando-receptor realizados a los opiáceos in vitro han demostrado que la M6G se une a los receptores opioides y es de 1 a 5 veces menos afín por los receptores  $\mu$  que la MOR<sup>10</sup>.

Otros metabolitos de la MOR, en particular la NMOR, han mostrado una cierta actividad analgésica. No obstante, estos otros metabolitos están presentes a unas concentraciones bajas y no son susceptibles de contribuir de forma significativa al efecto global de la MOR.

### **2.5.3.2 CODEÍNA**

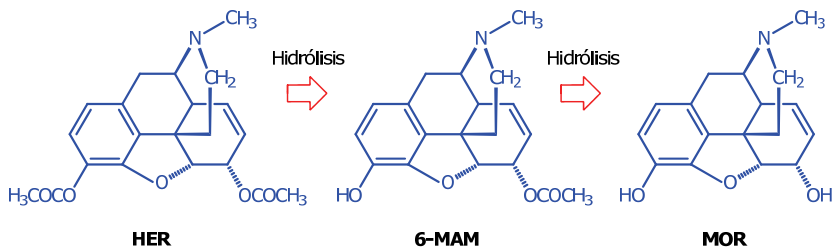
A diferencia de lo que ocurre con la MOR, en la COD la presencia del grupo éter en posición 3 imposibilita su metabolización como derivado 3-glucurónido, de ahí que las principales vías de metabolización sean a través de la hidrólisis del grupo éter dando MOR (10% de la dosis, la cual sigue su curso metabólico normal), N-desmetilación a norcodeína (NCOD) y por formación del derivado 6-O- $\beta$ -D-glucurónido (C6G)<sup>2</sup>.



**Figura 2.8.** Metabolismo de la COD.

### 2.5.3.3 HEROÍNA

La metabolización de la HER tiene lugar mediante hidrólisis del grupo acetilo en el carbono 3 para dar 6-MAM y posterior hidrólisis del otro grupo acetilo restante a MOR, cuya posterior metabolización tiene lugar siguiendo las rutas antes mencionadas<sup>2</sup>.



**Figura 2.9.** Metabolismo de la HER.

## 2.5.4 EXCRECIÓN

La MOR se excreta principalmente por vía renal con un aclaramiento de 2 L/h/kg<sup>3</sup>. Se excreta muy poca MOR inalterada, primordialmente se elimina como M3G por filtración glomerular. El 90% de la excreción total ocurre durante el primer día. Hay circulación enterohepática de la MOR y de sus glucurónidos, lo que explica la presencia de cantidades pequeñas del fármaco en las heces (7-10%) y en la orina durante varios días después de administrada la última dosis<sup>6</sup>. La M6G tiene una semivida de eliminación más prolongada que la MOR (4 horas frente a 2 horas)<sup>6</sup>, en neonatos el tiempo de vida media de la MOR se prolonga entre un 6 y un 10%<sup>3</sup> debido a que éstos tienen una mayor dificultad en transformar la MOR en sus glucurónidos.

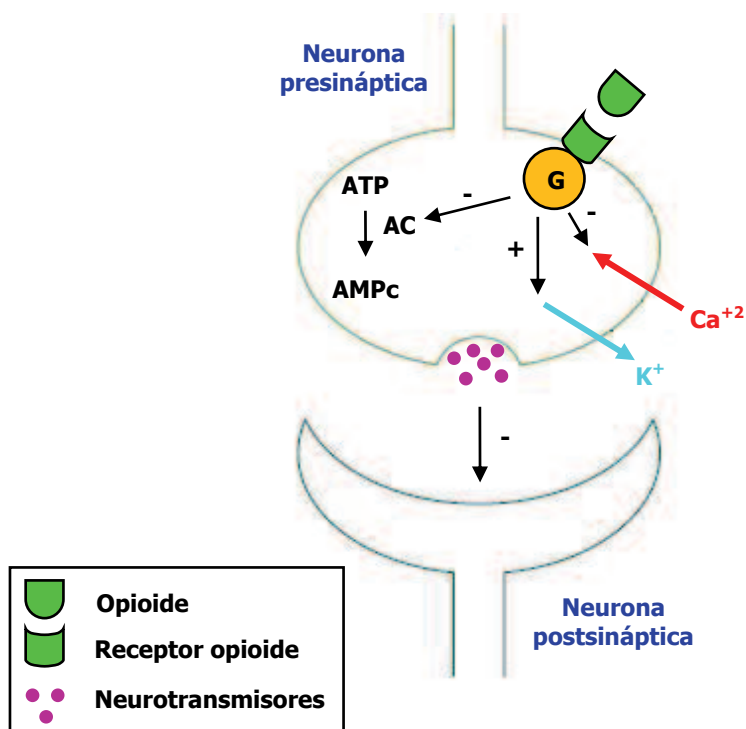
A diferencia de la MOR, la COD es aproximadamente un 60% más eficaz por la vía oral que por la parenteral, como analgésico y como depresor respiratorio. Muy pocos opioides tienen una razón de potencia oral/parental tan alta. La mayor eficacia oral de estos fármacos se debe al menor metabolismo de primer paso en el hígado. Una vez absorbida, la COD se metaboliza en el hígado y se excreta principalmente por la orina, en su mayor parte en formas inactivas<sup>6</sup>. Cantidades mínimas de COD y sus metabolitos son encontrados en las heces. Tras una dosis de COD, la mayor parte es excretada en un tiempo de 24 horas tras la administración, de 5 a 15% como COD inalterada y el resto como producto de conjugación glucurónido de COD y sus metabolitos. La vida media de COD en el plasma es de 2,5 a 3,5 horas<sup>3</sup>.

El aclaramiento de la HER es de 31 mL/kg/min<sup>3</sup>, superando con creces el flujo sanguíneo hepático y renal (que oscilan entre 80 L/h y 60 L/h, respectivamente, en un humano estándar de 70 kg), indicando que la HER es metabolizada principalmente en el tejido periférico y en la circulación. El alto aclaramiento de la HER del plasma se debe principalmente a la rápida eliminación por las esterasas, la hidrólisis espontánea de la HER en el ambiente de fluidos corporales y el elevado volumen de distribución<sup>8</sup>. Las semividas de eliminación de la HER y de la 6-MAM son de 3-5 min y 3-12 min, respectivamente<sup>7</sup>. Las vidas medias de la MOR, M3G y M6G como metabolitos de la HER son comparables con los datos obtenidos de los estudios farmacocinéticos después de administración de MOR<sup>8</sup>.

Tras la administración de HER, aproximadamente el 70% de la dosis total de HER se recupera en la orina, fundamentalmente como conjugados de MOR (55%), y en menor cantidad como 6-MAM (1,3%) y MOR (10%)<sup>8</sup>.

## 2.6 MECANISMO DE ACCIÓN

Los opioides producen sus acciones farmacológicas gracias a la fijación de una manera reversible y selectiva a unos receptores de membrana que se encuentran localizados predominantemente en el sistema nervioso (Figura 2.10). Actualmente se reconoce la existencia de tres tipos mayores de receptores opioides que corresponden a los receptores mu, delta y kappa, y cuyas características moleculares, bioquímicas y farmacológicas se encuentran bien definidas. Debe destacarse que se han definido al menos dos subclases de receptores mu y delta, y tres subclases de receptores kappa.



**Figura 2.10.** Mecanismo de acción de los opioides.

Como ya se ha explicado anteriormente, los opioides pueden actuar como agonistas (MOR, COD, HER, peptidina, metadona, fentanilo y sus derivados), agonistas parciales (buprenorfina) o antagonistas (naloxona y naltrexona) en uno o varios de los receptores opioides. Los opioides exógenos presentan el llamado dualismo farmacológico. Este fenómeno consiste en que dos fármacos opioides actuando sobre receptores distintos ( $\mu$ ,  $\kappa$ ) ejercen el mismo efecto farmacológico, por ejemplo, analgesia. Pero estos mismos fármacos pueden actuar como agonista en un receptor y agonista parcial o antagonista sobre otro, siendo el resultado de su interacción distinto (pentazocina, butorfanol o nalorfina)<sup>7</sup>.

La activación de los diferentes receptores opioides ya sea por agonistas exógenos o endógenos produce, por lo general, efectos de tipo inhibitorio sobre la transmisión sináptica. Aunque la localización de dichos receptores es variable, se encuentran principalmente ubicados en terminales de fibras presinápticas y su activación resulta en una disminución en la liberación de neurotransmisores. Los tres subtipos de receptores opioides poseen siete hélices transmembranarias y se encuentran acoplados a proteínas G que van a controlar el grado de fosforilación de nucleótidos de guanina. A través de la modificación en la estructura de estas proteínas G se producirá una inhibición en la actividad del enzima adenilciclase (AC) y ello da lugar a una disminución en los niveles intracelulares de adenosín monofosfato cíclico (AMPc). Dicha disminución de AMPc precipita una cascada de acontecimientos intracelulares, incluida la disminución de la actividad de un segundo enzima, la proteinquinasa, lo que resulta en una disminución de la fosforilación de proteínas. Se produce además una facilitación del cierre de los canales de calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) en las neuronas presinápticas, por lo que se reduce la liberación de neurotransmisor, así como la apertura de canales de potasio ( $\text{K}^{+}$ ) de las neuronas postsinápticas, lo que provoca una hiperpolarización de la membrana y como consecuencia una reducción de su activación. Por tanto, son receptores que median acciones inhibitorias<sup>7</sup>.

La administración continuada de opioides produce cambios moleculares y de la expresión génica que son los responsables de los fenómenos de tolerancia, dependencia y abstinencia<sup>7</sup>.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Seidenberg A, Honegger U. Metadona, heroína y otros opioides: manual para un tratamiento ambulatorio de mantenimiento con opioides. Madrid, Díaz de Santos, 2000, 30-31.
2. Gómez R. Aislamiento de la morfina: 200 años de un descubrimiento fundamental para la química moderna. *An Quím* 102(2) (2006) 45-53.
3. Leikin J, Paloucek F. *Poisoning and Toxicology Handbook*. Nueva York, CRC Press, 2008, 213.
4. Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías. El problema de la drogodependencia en Europa. Informe anual 2009. Luxemburgo, 2009.
5. Observatorio Español sobre Drogas (OED). Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas (DGPNSD). Informe 2007. Situación y tendencias de los problemas de drogas en España.
6. Goodman LS. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Volumen 1. México, MacGraw Hill, 2006, 570.
7. Álvarez Y, Farré M. Farmacología de los opioides. *Adicciones* 17(2) (2005) 21-40.
8. Rook EJ, Huitema AD, van den Brink W, van Ree JM, Beijnen JH. Pharmacokinetics and pharmacokinetic variability of heroin and its metabolites: review of the literature. *Curr Clin Pharmacol* 1(1) (2006) 109-118.
9. Aderjan RE, Skopp G. Formation and clearance of active and inactive metabolites of opiates in humans. *Ther Drug Monit* 20(5) (1998) 561-569.
10. Frances B, Gout R, Monsarrat B, Cros J, Zajac JM. Further evidence that morphine-6 $\beta$ -glucuronide is a more potent opioid agonist than morphine. *J Pharmacol Exp Ther* 262(1) (1992) 25-31.



A photograph of a pregnant woman's arm and hand holding a glass of white wine. The woman is wearing a black strapless top. The background is a plain, light-colored wall. The image is partially covered by a dark blue vertical bar on the left side, which contains the chapter title and number.

**Capítulo**

**3**

**Introducción:  
Drogas y embarazo**



## Capítulo 3. Introducción: Drogas y embarazo

<b>3.1</b>	PREVALENCIA DEL CONSUMO DE DROGAS DURANTE EL EMBARAZO.....	45
<b>3.2</b>	PRINCIPIOS FARMACOCINÉTICOS EN EL EMBARAZO.....	47
<b>3.2.1</b>	LA MADRE .....	49
<b>3.2.2</b>	LA PLACENTA .....	49
<b>3.2.3</b>	EL FETO .....	51
<b>3.3</b>	MODELOS FARMACOCINÉTICOS PARA LA UNIDAD MATERNO-FETAL.....	53
<b>3.4</b>	EFFECTOS DEL CONSUMO DE DROGAS DURANTE EL EMBARAZO.....	55
<b>3.4.1</b>	COCAÍNA.....	56
<b>3.4.1.1</b>	EFFECTOS FETALES.....	56
<b>3.4.1.2</b>	EFFECTOS NEONATALES.....	57
<b>3.4.1.3</b>	ALTERACIONES NEUROCONDUCTUALES .....	57
<b>3.4.1.4</b>	ALTERACIONES ESTRUCTURALES.....	58
<b>3.4.1.5</b>	ALTERACIONES DEL DESARROLLO Y LA CONDUCTA.....	58
<b>3.4.1.6</b>	ALTERACIONES DEL METABOLISMO ENERGÉTICO CEREBRAL.....	59
<b>3.4.2</b>	OPIOIDES.....	60
<b>3.4.2.1</b>	EFFECTOS FETALES.....	60
<b>3.4.2.2</b>	EFFECTOS NEONATALES.....	61
<b>3.4.2.3</b>	ALTERACIONES DEL DESARROLLO Y LA CONDUCTA.....	62
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63



### 3.1 PREVALENCIA DEL CONSUMO DE DROGAS DURANTE EL EMBARAZO

La mayor parte de las investigaciones sobre la prevalencia del consumo de drogas durante el embarazo proceden exclusivamente de América del Norte<sup>1-32</sup>. Según estas investigaciones, llevadas a cabo en distintos tipos de poblaciones, la prevalencia en Norteamérica oscila entre el 0,5 y el 50%. Solamente se ha encontrado una investigación procedente de América del Sur, concretamente de Brasil, donde la prevalencia es del 6% (1,7% COC, 4% marihuana y 3% ambas)<sup>33</sup>.

En Europa, este gran problema del consumo de drogas durante el embarazo ha sido prácticamente ignorado a pesar de que las encuestas europeas<sup>34,35</sup> refieren el consumo de drogas en mujeres en edad fértil.

Son muy pocos los estudios realizados en Europa sobre la prevalencia del consumo de drogas de abuso durante el embarazo. El primer estudio que encontramos en la bibliografía realizado en Suiza<sup>36</sup> a través del *screening* de muestras de meconio, demostró una prevalencia del 11% (4,24% opiáceos y 0,25% COC).

En Reino Unido se han llevado a cabo cuatro estudios, dos referentes a la ciudad de Londres<sup>37,38</sup>, uno a la ciudad de Blyth<sup>39</sup> y uno más reciente referente a la ciudad de Glasgow<sup>40</sup>. Los tres primeros trabajos emplean la orina materna para documentar la exposición aguda a drogas ilegales, demostrando prevalencias respectivas del 10,6% (1,1% COC y 1,4% opiáceos), 16,7% (0,37% COC y 1,36% opiáceos) y 10,7%. En el último estudio, a través del análisis del meconio, se ha observado una prevalencia del consumo de COC del 2,75%.

En Italia, se han realizado tres estudios. Uno de ellos, llevado a cabo en Roma<sup>41</sup>, se refiere al empleo del análisis del vello púbico materno, observándose una prevalencia del consumo de COC en un grupo de 615 mujeres embarazadas, del 1,9%. Los otros dos, realizados en Roma<sup>42</sup> y en Pavia<sup>43</sup>, analizan el meconio del recién nacido estableciendo prevalencias de consumo de drogas del 8,4% (0,2% COC y 0,77% opiáceos) y del 0,26% (0,26% COC y 0% opiáceos), respectivamente.

En España, datos del 2005 publicados por el OED revelan que el 2,5% de las mujeres entre 15 y 35 años de edad admitían consumo de COC durante los 12 meses anteriores, y el 0,1% admitían consumo de HER<sup>44</sup>. Sin embargo, a pesar de estos datos, en la bibliografía solamente se han encontrado tres estudios llevados a cabo en España sobre la prevalencia del consumo de drogas durante el embarazo<sup>45-47</sup>.

En el primero de ellos se refleja la prevalencia del uso de COC en embarazadas con una edad media de 27,8 años y fue llevado a cabo en Barcelona por Martínez Crespo y cols.<sup>45</sup>. El estudio incluyó a 1773 mujeres que dieron a luz en el Hospital Clínico y Provincial de Barcelona. La prevalencia del consumo de drogas se ha evaluado a través de un cuestionario y de un *screening* de orina. Mediante el cuestionario se ha estimado una prevalencia del 7,6% (COC 0,2% y HER 1,1%) y mediante el *screening* de orina del 7,7% (COC 0,8% y HER 1,7%). A la vista de los resultados se puede deducir que en esta institución, el uso de drogas ilícitas es común en mujeres embarazadas, sin embargo la COC no parece ser tan prevalente como en América.

El segundo y tercer estudios están relacionados con el "Proyecto Meconio" llevado a cabo también en Barcelona. En el 2005 se han publicado los resultados preliminares de este proyecto<sup>46</sup> y en el 2009 los resultados definitivos<sup>47</sup>. El objetivo principal del proyecto ha sido estimar la prevalencia del consumo de drogas (HER, COC, cannabis y anfetaminas) en las mujeres embarazadas, y los efectos de la exposición crónica a drogas ilegales en el feto y el recién nacido, basado en un cuestionario, en el análisis de meconio, y en observaciones clínicas sobre la somatometría neonatal (peso, talla, perímetro craneal, índice ponderal, *brain-to-body ratio*).

El estudio ha sido realizado entre octubre de 2002 y febrero de 2004, incluyendo en el mismo a 1.209 parejas madre-recién nacido del Hospital del Mar de Barcelona. A través de un cuestionario se recogieron datos sobre las características socioeconómicas y demográficas (nacionalidad, ocupación y clase laboral de los padres, edad materna, embarazos, recién nacidos prematuros y abortos previos) y los hábitos tóxicos durante el embarazo. También se recogió el meconio neonatal antes de 24 horas después del nacimiento y se analizó empleando técnicas cromatográficas estandarizadas para detectar opiáceos, COC, cannabinoides y anfetaminas.



El análisis del meconio demostró una positividad para las drogas de abuso del 10,9%, con una prevalencia específica de exposición fetal a HER, COC y cannabis del 4,7; 2,6 y 5,3%, respectivamente. El cuestionario estructurado detectó que el 0,3; 1,2 y 1,5% de las madres habían consumido, respectivamente, HER, COC y cannabis. Sólo una madre declaró el consumo de éxtasis, confirmado mediante el análisis del meconio. La etnia de los padres y la clase laboral no se asociaron con el consumo de drogas. Las madres consumidoras de drogas mostraron un número de abortos previos más elevado que las madres no consumidoras. Se encontró que el peso y la talla al nacimiento eran significativamente más bajos en los recién nacidos de las madres expuestas a COC sola o en combinación con otras drogas.

### **3.2 PRINCIPIOS FARMACOCINÉTICOS EN EL EMBARAZO**

Los cambios farmacocinéticos durante el embarazo deben considerarse en el contexto de una unidad integrada de múltiples compartimentos: madre-placenta-membranas extraamnióticas-líquido amniótico-feto. Cada uno tiene funciones propias, con características genéticas o celulares y controles diferentes<sup>48</sup>.

Las fisiologías materna y fetal pueden ejercer una influencia compleja sobre la biodisponibilidad de una droga y, por lo tanto, sobre su respuesta en el organismo<sup>48</sup>.

Cuando se utiliza la vía intravenosa para el consumo de drogas, la concentración en el plasma fetal se incrementa debido a que se establece un gradiente materno-fetal con tendencia al equilibrio, momento que coincide con el pico de la concentración fetal. Conforme la droga se depura del plasma materno, el gradiente de difusión se revierte y la concentración fetal declina. Así, los niveles fetales de una droga dependen no sólo de la transferencia placentaria sino también de la velocidad de eliminación materna de la droga. Si la velocidad de transferencia placentaria es más lenta con relación a la velocidad en la que la droga se elimina de la madre, entonces las concentraciones de la droga no alcanzarán niveles altos en el feto<sup>48</sup>.

La velocidad y extensión de la distribución de la droga al feto puede modificarse según la vía de administración empleada, siendo menor la exposición con la vía intramuscular en relación a la vía intravenosa<sup>48</sup>.

Cuando el consumo de droga es repetido, la concentración de la droga alcanza un estado estable tanto en la madre como en el feto. De aquí que bajo condiciones de estado estable o estacionario, además de la permeabilidad placentaria y la eliminación materna de drogas, sea importante considerar la unión a proteínas y la eliminación fetal de la droga<sup>49</sup>.

El feto es un sitio de localización o fijación, metabolismo y excreción seleccionado. Además de un sitio para la acción de una sustancia química, puede constituir un depósito<sup>48</sup>.

Se debe considerar la posibilidad de que la droga y sus metabolitos se excreten por el riñón fetal y, por tanto, recirculen del feto a la orina y de ésta al líquido amniótico, a la vía gastrointestinal o piel fetal (el feto humano produce de 15 a 20 mL/h de orina y deglute de 5 a 7 mL/h de líquido amniótico). En consecuencia, el líquido amniótico puede funcionar como un reservorio, especialmente para metabolitos polares<sup>50</sup>. Para drogas liposolubles, la velocidad de eliminación de la droga está determinada por las características de eliminación materna, lo cual sugiere que la depuración placentaria es la vía predominante de eliminación fetal de drogas liposolubles<sup>48</sup>.

Por otra parte, se ha demostrado que la placenta tiene la capacidad de metabolizar drogas a compuestos más activos o tóxicos; también puede actuar como un depósito. Por tanto, es posible que la placenta module la eliminación de la droga produciendo metabolitos y reteniendo grandes cantidades para su liberación de regreso al feto<sup>51</sup>. No se puede suponer que todas las drogas se transferirán rápidamente a la madre; más bien, es posible que estos agentes se distribuyan de preferencia a los órganos fetales, por ejemplo al encéfalo, en base a su liposolubilidad y fijación específica en sitios receptores fetales. Muchos receptores en el SNC y otros órganos fetales aparecen tempranamente durante el desarrollo<sup>52</sup>.

### **3.2.1 LA MADRE**

Durante el embarazo la absorción de las drogas consumidas por vía oral se modificará debido a la combinación tanto del retraso en el vaciamiento gástrico como de la disminución de la motilidad intestinal. La consecuencia de un vaciamiento gástrico más lento puede ser una reducción en el ritmo de absorción de la droga, en relación con el retardo en el ingreso al intestino delgado. El paso más lento a través del intestino delgado puede, sin embargo, aumentar la absorción de ciertas drogas<sup>53</sup>. La absorción en sitios diferentes al tracto gastrointestinal también puede afectarse; por ejemplo, la absorción pulmonar se incrementa como resultado de un incremento en la superficie y en el flujo sanguíneo<sup>54</sup>.

El volumen aparente de distribución de varias drogas se incrementa durante el embarazo conforme se expande el volumen plasmático, aproximadamente un 40-50%, desde el inicio de la gestación hasta alcanzar su punto máximo a las 32 semanas. Se presentan cambios concomitantes en el gasto cardiaco y en la tasa de filtración glomerular. La expansión del volumen aparente de distribución junto con un incremento en la depuración renal lleva a una disminución en la concentración materna circulante de la droga. El flujo sanguíneo hepático permanece constante, de modo que el porcentaje del gasto cardiaco total destinado al hígado disminuye, con lo que puede reducirse el metabolismo de primer paso hepático de algunas drogas, lo que puede provocar una elevación en su concentración plasmática. La colestasis se desarrolla frecuentemente durante el embarazo y puede causar una disminución en la depuración de fármacos que sufren excreción biliar<sup>53,54</sup>.

### **3.2.2 LA PLACENTA**

Durante mucho tiempo se habló de la barrera placentaria como un mecanismo de defensa que preservaría la integridad del ser en desarrollo frente a las agresiones químicas que le pudieran llegar a través de la sangre materna. Actualmente se sabe que la barrera placentaria no existe, y que la mayoría de las sustancias químicas pueden atravesar la placenta y llegar al embrión y feto<sup>55</sup>.

La cinética de transferencia de drogas al feto ha sido revisada<sup>56</sup>, y se ha sugerido que las drogas llegan al feto por diferentes vías:

1. Difusión pasiva de pequeñas moléculas liposolubles a través de la barrera placentaria, que pueden ser metabolizadas por el feto en función de la edad gestacional.

Esta transferencia no requiere energía y depende de la concentración de la droga a través de la placenta, el área a través de la que ocurre la transferencia y el grosor de la membrana, tal como describe la ecuación de Fick:

$$\text{Velocidad de difusión} = \frac{D A \Delta C}{d}$$

**Ecuación 3.1.** Ecuación de Fick.

En donde **D** es la constante de difusión de la droga, **A** es el área a través de la que ocurre la transferencia, **ΔC** es la concentración de la droga a través de la placenta (concentración plasmática materna-concentración plasmática fetal) y **d** es el grosor de la membrana.

La constante de difusión **D** está determinada por las características de las drogas tales como su peso molecular, pKa, solubilidad lipídica, estado de ionización y unión a proteínas.

En general compuestos con peso molecular superior o igual a 1000 Da no cruzan rápidamente la placenta, mientras que aquellos con peso molecular igual o inferior a 600 Da sí lo hacen. La mayoría de los fármacos y drogas de abuso están entre los 250 y 400 Da, y por tanto, cruzan fácilmente la placenta. El pH de la sangre fetal es relativamente ácido en comparación con el de la sangre materna, por eso las drogas básicas tienden a alcanzar mayores concentraciones en sangre fetal. Diversos estudios han puesto de manifiesto que drogas como la COC, marihuana y HER, entre otras, pueden atravesar la barrera placentaria. Las sustancias químicas pueden incluso actuar como teratógenos afectando directamente a la función de la placenta, e impidiendo el aporte de oxígeno y nutrientes al feto<sup>55</sup>.

El transporte placentario de sustancias se establece alrededor de la quinta semana de vida embrionaria, pero antes de formarse la placenta cualquier sustancia puede actuar directamente sobre las células embrionarias o sobre los órganos maternos, alterando de forma indirecta el desarrollo fetal<sup>57,58</sup>.

A medida que la placenta madura, el espesor del epitelio trofoblástico disminuye y aumenta la superficie de contacto, lo cual conlleva a que se eleve la velocidad de difusión de las sustancias cuando la placenta tiene mayor edad<sup>59</sup>. Por otra parte, la eliminación de sustancias psicoactivas en el compartimiento fetal se realiza por difusión hacia el compartimiento materno, pero muchos metabolitos quedan en la porción fetal hasta que el riñón adquiere capacidad para eliminar las drogas circulantes al líquido amniótico<sup>57,59</sup>. Esta capacidad de eliminación reducida y la circulación fetal a través de la vena umbilical, que alcanza directamente su corazón y cerebro sin paso previo por el hígado, implica una disminución en el metabolismo de las drogas haciendo que el efecto de sustancias psicoactivas en el feto sea mayor<sup>59</sup>.

2. Unión de las drogas y/o sus metabolitos a las proteínas en el líquido amniótico, que posteriormente es ingerido por el feto. La ingestión continuada del líquido amniótico puede prolongar la exposición fetal a las drogas.

### **3.2.3 EL FETO**

Desde la perspectiva de la distribución fetal de la droga es conveniente resaltar que, dado que las drogas que atraviesan la placenta llegan al feto por la sangre venosa umbilical, y de ésta, el 50% entra en la circulación hepática y el resto atraviesa el ducto venoso; entonces, la mitad de la droga transportada es susceptible de metabolismo hepático y la otra mitad ingresa a la circulación fetal directamente<sup>48</sup>.

La distribución de una droga en el feto constituye un factor determinante en el grado de exposición fetal y es en gran parte regulado por variaciones en el pH y en la unión a proteínas<sup>48</sup>.

Al inicio del embarazo, el pH intracelular en el feto es mayor que en la madre, lo cual resulta en el secuestro de ácidos débiles y en la acumulación potencial de drogas ácidas

en los tejidos fetales. Conforme avanza la edad gestacional, el pH intracelular fetal se hace más ácido, con el potencial atrapamiento de bases débiles. Durante el embarazo también pueden ocurrir variaciones en la unión a proteínas fetales<sup>60</sup>. La concentración de la glucoproteína ácida- $\alpha$ 1, la cual une drogas lipofílicas ácidas, disminuye en el feto en relación con la madre a lo largo del embarazo, siendo insignificante a las 16 semanas de gestación y correspondiendo a un tercio de la concentración materna al momento del parto. La albúmina, la cual se une a drogas ácidas lipofílicas, está presente desde las semanas 12-15 de gestación, no obstante las concentraciones maternas superan en 3-4 veces las fetales. Sin embargo, conforme transcurre el embarazo, las concentraciones fetales de albúmina se incrementan en comparación con las maternas y a término son aproximadamente 20% mayores que las concentraciones maternas<sup>61</sup>.

Los sistemas enzimáticos fetales destinados a la biotransformación se forman desde las semanas 5-8 de gestación y su actividad se incrementa hasta las semanas 12-14, cuando alcanza alrededor del 30% de la actividad del adulto. No es sino hasta el primer año de vida posnatal, que el sistema enzimático hepático se puede comparar con el del adulto<sup>62</sup>. El primer sistema que se expresa es el citocromo P450 es más activo en la glándula adrenal fetal que en el hígado y también está presente en el riñón e intestino. Las monooxigenasas están compuestas de un conjunto de formas inducibles y puede dividirse en dos grupos principales de acuerdo a las sustancias que inducen su actividad: fenobarbital o hidrocarburos aromáticos policíclicos<sup>63</sup>.

La alcohol deshidrogenasa aparece durante las primeras seis semanas de gestación<sup>64</sup>.

Los fetos humanos generalmente tienen bien desarrollada la actividad enzimática de conjugación, excepto por la glucuronidación, la cual continúa baja hasta poco después del nacimiento a término<sup>65</sup>. El metabolismo fetal puede generar intermediarios tóxicos indicando la participación del feto y de su estructura genética como factores en la susceptibilidad al desarrollo de toxicidad.

La presencia de drogas en los líquidos fetales y amniótico procede de su paso a través de la orina, la cual se excreta dentro del líquido amniótico o sacos alantoicos, por transferencia a través de la piel fetal o por transporte directo desde la madre a las membranas corioalantoicas<sup>66</sup>.

### 3.3 MODELOS FARMACOCINÉTICOS PARA LA UNIDAD MATERNO-FETAL<sup>48</sup>

Los modelos farmacocinéticos representan simplificaciones del modelo biológico real, facilitan la comprensión del fenómeno y permiten realizar predicciones exactas sobre la disposición del fármaco/droga en el organismo. Desde la perspectiva de la unidad materno-fetal, su diseño es particularmente importante debido a que los efectos de un fármaco en los tejidos fetales están, en gran parte, determinados por el tiempo de exposición, y éste, a su vez, por los procesos de distribución y excreción de los compartimentos materno y fetal.

Los fármacos, una vez dentro del organismo, tienden a desplazarse entre los distintos compartimentos corporales. El análisis del fenómeno comienza con el estudio de los cambios en la concentración del fármaco en un compartimento en función del tiempo, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{dC}{dt} = -KC_n$$

**Ecuación 3.2.** Cambio en la concentración del fármaco en un compartimento en función del tiempo.

En donde **dC/dt** representa el cambio en la concentración en relación al tiempo, y **-KC<sub>n</sub>** se refiere a que la disminución en la concentración de un fármaco es una función de tipo exponencial.

Cuando n es igual a cero, el proceso es de orden cero y la velocidad de cambio es independiente de la concentración del fármaco:

$$\frac{dC}{dt} = -K$$

**Ecuación 3.3.** Cinética de orden cero.

Es lo que ocurre en los fenómenos saturables.

Cuando  $n$  es 1, el proceso es de primer orden y la velocidad de cambio es proporcional a la concentración del fármaco:

$$\frac{dC}{dt} = -KC$$

**Ecuación 3.4.** Cinética de primer orden.

Cuando el fármaco después de ingresar en el organismo se distribuye en un compartimento homogéneo y después se elimina siguiendo un proceso de primer orden, se considera un modelo abierto de un compartimento.

Cuando el sistema biológico está formado por un compartimento central en el que el fármaco se absorbe y se elimina, y un compartimento periférico comunicado con el anterior en donde la distribución del fármaco es un proceso reversible entre dos compartimentos, entonces se trata de un modelo abierto de dos compartimentos.

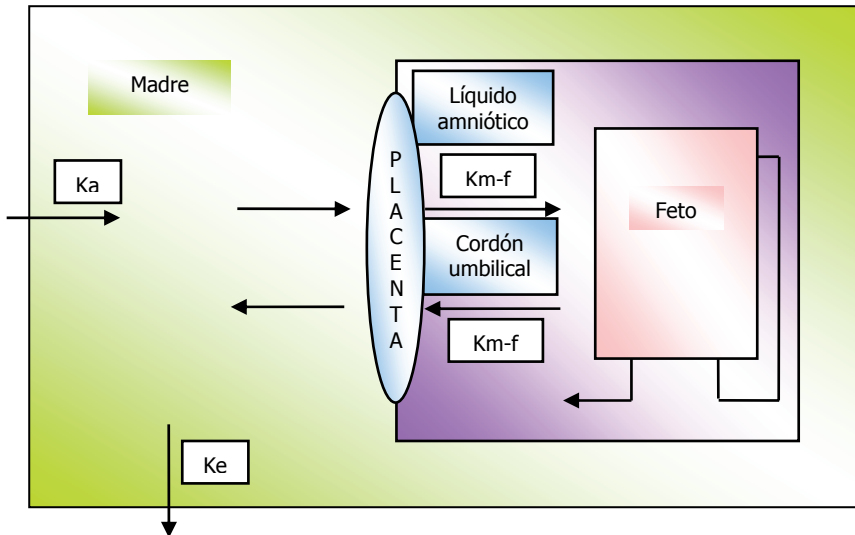
En la unidad materno-fetal, un fármaco administrado a la madre se transfiere de la placenta al feto vía la vena umbilical y regresa del feto a la placenta vía las arterias umbilicales. El modelo más simple para este fenómeno es el de dos compartimentos representados por la madre y el feto con distribución bidireccional entre ellos (Figura 3.1)<sup>67</sup>. Existen dos modelos de este tipo:

1. El fármaco es eliminado sólo por la madre.
2. El fármaco es eliminado por la madre y el feto.

Todos los procesos de distribución y eliminación siguen cinéticas de primer orden. La eliminación materna es el resultado tanto de la excreción del fármaco como de la distribución al feto y depende de la concentración del fármaco en el compartimento materno. En el caso de la eliminación fetal, ésta se deriva del proceso de biotransformación y de la transferencia feto-madre. La concentración fetal del fármaco será menor que la de la madre sólo si:



1. La velocidad de eliminación materna es mayor que la velocidad de transferencia materno-fetal.
2. La velocidad de transferencia feto-madre es mayor que la madre-feto.
3. El feto o la placenta biotransforman el fármaco.



**Figura 3.1.** Modelo materno-fetal ( $k$ = constantes de proporcionalidad correspondientes a las velocidades de absorción, distribución y eliminación).

### 3.4 EFECTOS DEL CONSUMO DE DROGAS DURANTE EL EMBARAZO

La utilización de drogas ilícitas por parte de la mujer embarazada conlleva una situación de alto riesgo para la madre, el feto y el recién nacido<sup>68</sup>.

Es difícil estimar el alcance total de las consecuencias del uso de la droga en las mujeres embarazadas y, por varias razones, es muy problemático determinar el peligro específico de una droga en particular sobre el feto. Hay muchos factores, como la cantidad y el número total de drogas de las que la madre abusó, los cuidados prenatales recibidos, la posible negligencia o abuso del niño, la exposición a la violencia, las condiciones socioeconómicas, el estado de nutrición materna, la posibilidad de que la

madre haya estado expuesta a enfermedades de transmisión sexual, y otros problemas de salud, que pueden contribuir a la dificultad para determinar el impacto directo, tanto maternal como infantil, del uso de drogas durante el período de gestación.

### **3.4.1 COCAÍNA**

Desde la introducción de la COC en el mercado, sus posibles efectos en el embarazo han generado una gran curiosidad entre la comunidad científica, que se ha reflejado en la abundante bibliografía al respecto. Así, a mediados de los 80, cuando empezaron a nacer los primeros hijos de madres adictas a la COC, se acuñó el término *bebé crack* para denominar a estos niños que previsiblemente tendrían un elevado riesgo de padecer daños irreversibles a nivel emocional e intelectual, que los haría irrecuperables para la sociedad. Los numerosos y exhaustivos estudios longitudinales iniciados a partir de entonces han constatado, sin embargo, que ese temor era infundado y que la mayoría de los efectos inicialmente atribuidos a la COC se correlacionan con otros factores concomitantes a su uso (alcohol, marihuana, tabaco, desnutrición materna, etc.). En este momento se cree que la figura del *bebé crack* es un mito. No obstante, la mayoría de estos estudios se basan en los efectos del *crack* en mujeres afroamericanas, por lo que puede ser peligroso hacer una simple extrapolación de los datos a otras poblaciones y a otras modalidades de consumo<sup>55</sup>.

#### **3.4.1.1 EFECTOS FETALES**

El uso de COC se asocia a un amplio rango de efectos adversos para el embarazo, y el mecanismo por el cual se producen la mayoría de estos efectos adversos se cree debido a los efectos vasoconstrictores sobre la vasculatura materna y fetal. Estudios en animales han confirmado que la COC reduce el flujo arterial en el útero y la placenta, provocando una disminución en el aporte de oxígeno y nutrientes al feto. La alteración en la vascularización uterina y fetal puede ocasionar también las distintas anomalías congénitas que se han asociado al uso de COC. Parece que la vasoconstricción intermitente y la vasodilatación de rebote pudieran ser los responsables de las distintas malformaciones. Los defectos observados en estudios en roedores comparten muchas similitudes con los humanos, siendo la etiología sugestiva de un fenómeno de disrupción vascular. El descenso en el flujo sanguíneo uterino placentario y fetal puede provocar

hemorragia y edemas, seguidos de necrosis y reabsorción de los tejidos afectados, causando la destrucción de las estructuras formadas<sup>55</sup>.

Entre las complicaciones más habituales durante el embarazo se incluyen el aborto, la muerte fetal intraútero y el desprendimiento prematuro de la placenta. El riesgo de esta última se estima entre 5 y 20 veces superior al de la población general, y es posible que se deba a que la vasoconstricción causada por la COC pueda disminuir la adherencia de la placenta a la pared uterina<sup>55</sup>.

#### **3.4.1.2 EFECTOS NEONATALES**

Entre los efectos neonatales cabe mencionar valores bajos de Apgar, peso, talla y perímetro craneal<sup>69-71</sup>. El bajo peso puede deberse a la falta de crecimiento del feto, al nacimiento prematuro o a una combinación de ambos factores. El riesgo de que un bebé de bajo peso muera durante su primer mes de vida es 20 veces mayor que el de un bebé de peso normal. El síndrome de muerte súbita neonatal es muy elevado (15%)<sup>72</sup>.

Algunos estudios<sup>69</sup> concluyen que los efectos neonatales adversos asociados con la exposición fetal a la COC siguen una relación dosis-respuesta. En cambio, otros<sup>73-75</sup> afirman que las mujeres que consumen COC durante el embarazo presentan numerosas alteraciones en su vida que pueden afectar en el curso de su gestación, entre las cuales el consumo de COC sólo es un marcador más, que no parece influir en la prevalencia de bajo peso al nacer o de parto pretérmino. Entre otros efectos se ha descrito un aumento notable de los casos de enterocolitis necrosante y de muerte súbita<sup>75</sup>.

#### **3.4.1.3 ALTERACIONES NEUROCONDUCTUALES**

Entre las posibles alteraciones neuroconductuales se incluyen: cuadro transitorio de irritabilidad del SNC (temblores, irritabilidad, hiperreflexia, etc.), de instauración precoz y de escasa intensidad (pero que dificulta la instauración del vínculo entre madre e hijo), que podría estar en relación con la presencia de la droga en el SNC del recién nacido. El síndrome de abstinencia propiamente dicho, es menos claro que para los opiáceos, y en caso de presentarse sería en el segundo o tercer día<sup>55</sup>.

Se ha podido establecer una diferencia entre los efectos sobre la conducta del recién nacido producidos por la COC (neonatos letárgicos) y sus metabolitos, como la BE y NCO (signos de neuroexcitación)<sup>76</sup>. Como se ha demostrado en estudios de mujeres embarazadas consumidoras de COC, estas alteraciones neuroconductuales pueden aparecer, incluso, si sólo se ha consumido COC durante el primer trimestre de la gestación, a diferencia de la HER, que no causa síndrome de abstinencia neonatal (NAS, *Neonatal Abstinence Syndrome*) si no se ha consumido durante el último mes del embarazo.

#### **3.4.1.4 ALTERACIONES ESTRUCTURALES**

Existe una gran controversia sobre la capacidad de la COC de provocar defectos estructurales, y la mayoría de los defectos asociados a esta droga podrían ser debidos a hipoxia, isquemia o hemorragia. Entre los defectos físicos asociados al uso de COC están las anomalías del tracto genitourinario, la reducción de extremidades, atresia intestinal y la microsomía hemifacial. De todos ellos, solo se ha demostrado una relación estadísticamente significativa para las malformaciones del tracto genitourinario<sup>55</sup>.

#### **3.4.1.5 ALTERACIONES DEL DESARROLLO Y LA CONDUCTA**

También existe una gran controversia en torno a los efectos a largo plazo de la exposición prenatal a la COC sobre la estructura y la función del SNC del recién nacido.

Así, un estudio<sup>75</sup> concluye que en niños menores de 6 años no existe evidencia convincente de que la exposición prenatal a la COC se asocie de manera independiente a efectos tóxicos del desarrollo tanto físico (crecimiento) como conductual. Otros investigadores en el 2004<sup>77</sup> y en el 2007<sup>78</sup> también informaron que no existen efectos de la exposición prenatal a COC en el crecimiento durante la infancia.

Sin embargo, otro estudio publicado en el 2007<sup>79</sup> en el que se siguió la evolución de 224 niños desde su nacimiento hasta los 10 años, ha demostrado que la exposición prenatal a la COC tiene un efecto duradero sobre el crecimiento infantil. Estos niños, en promedio, eran más bajos, pesaban menos y tenían una circunferencia de cabeza más pequeña que el resto de los niños a los 10 años.

En referencia al desarrollo cognitivo, numerosos estudios han demostrado que no existen efectos perjudiciales de la exposición prenatal a COC en el desarrollo cognitivo durante la infancia, medido por el índice de desarrollo mental de la escala de Bayley del desarrollo infantil (BSID, *Bayley Scales of Infant Development*)<sup>80,81</sup>. Solamente algunos estudios han afirmado la existencia de efectos perjudiciales. Alessandri y cols.<sup>82</sup> encontraron un bajo desarrollo mental asociado a la exposición prenatal a COC a los 18 meses del nacimiento, pero no a los 8 meses, Singer y cols.<sup>83</sup> a los 12, 17 y 24 y Behnke y cols.<sup>84</sup> a los 6.

En el desarrollo motor, medido por el índice de desarrollo psicomotor de la BSID o de la escala de Peabody del desarrollo motor (PDMS, *Peabody Developmental Motor Scales*), muchos investigadores tampoco encontraron efectos perjudiciales de la exposición prenatal a COC. Sin embargo, de nuevo Singer y cols.<sup>83</sup> encontraron asociación de la exposición prenatal a COC con bajos desarrollos motores a los 17 meses aproximadamente, Fetters y col.<sup>85</sup> a los 7 y Miller-Loncar y cols.<sup>86</sup> en la infancia temprana, sin embargo estos investigadores mostraron que a los 18 meses ya no existían diferencias significativas.

Una preocupación todavía vigente hace referencia a la predisposición a un mayor riesgo de desarrollo de conductas adictivas en la adolescencia, y los estudios en animales así lo indican. La exposición prenatal a la COC podría incrementar el número de receptores cerebrales para la dopamina, predisponiendo al individuo a una reacción exagerada a las drogas de abuso<sup>55</sup>.

### **3.4.1.6 ALTERACIONES DEL METABOLISMO ENERGÉTICO CEREBRAL**

Se ha sugerido la aparición de anomalías del metabolismo energético en el cerebro de los recién nacidos expuestos a la COC durante la vida intrauterina<sup>87</sup>. Este estudio ha examinado los efectos neurotóxicos de la exposición prenatal a la COC mediante espectroscopía con resonancia magnética de protones, encontrando, al igual que en los adultos consumidores, un aumento de creatinina junto con un valor de noradrenalina (N-acetil aspartato, marcador de integridad neuronal) relativamente normal en el lóbulo frontal de niños expuestos con problemas de atención y conducta, según los padres. Así pues, destaca, en ausencia de anomalías estructurales, una alteración del metabolismo

energético celular (probablemente como resultado de numerosos episodios de flujo sanguíneo uterino disminuido hacia el feto).

### **3.4.2 OPIOIDES**

El abuso de HER durante el embarazo, conjuntamente con los muchos factores ambientales asociados (por ejemplo, la falta de cuidados prenatales), ha sido vinculado a efectos adversos. El mantenimiento con metadona, en combinación con cuidados prenatales y un programa de tratamiento integral para el abuso de drogas, puede aminorar muchas de las consecuencias negativas, tanto en la madre como en el recién nacido, que suelen estar asociadas con el abuso de la HER en las mujeres que no reciben tratamiento. No obstante, los bebés expuestos a la metadona en el embarazo generalmente requieren tratamiento para los síntomas del NAS. Varios estudios realizados en los Estados Unidos han encontrado que la buprenorfina es tan eficaz y segura como la metadona en el tratamiento ambulatorio de pacientes con dependencia a los opioides. Dado este nivel de eficacia en los adultos, los estudios actuales están tratando de establecer la seguridad y la eficacia de la buprenorfina en las mujeres embarazadas con dependencia a los opioides. En el caso de las mujeres que no quieren o no pueden recibir farmacoterapia para su adicción a la HER, se puede lograr la desintoxicación de los opiáceos durante el embarazo con una relativa seguridad, aunque se debe tomar en cuenta la posibilidad de recaer en el uso de la HER.

#### **3.4.2.1 EFECTOS FETALES**

La exposición intraútero a los opioides provoca la fluctuación cíclica del feto entre un estado de intoxicación y un estado de privación de la droga, provocando sufrimiento fetal intermitente. Durante los períodos de abstinencia es posible que falle el aporte de oxígeno al feto, especialmente en las fases más avanzadas de la gestación, que se refleja en un retardo del crecimiento intrauterino, que es una constante para este tipo de exposición<sup>55</sup>.

### 3.4.2.2 EFECTOS NEONATALES

Hasta la mitad de los bebés de mujeres que consumen HER nacen con bajo peso<sup>88</sup>. Estos bebés, muchos de los cuales son prematuros, suelen sufrir serios problemas de salud inmediatamente después de nacer, incluidos problemas de respiración, y tienen un mayor riesgo de padecer incapacidades permanentes. El consumo de HER durante el embarazo, también puede aumentar el riesgo de varios defectos congénitos<sup>88</sup>. Sin embargo, aún no se ha determinado si estos efectos se deben directamente a la droga, o si están relacionados con los malos hábitos de salud común en las mujeres que consumen HER, o si obedecen a las sustancias con las que suele mezclarse la HER cuando se elabora.

Pero, de todos los efectos negativos observados, el más devastador y potencialmente mortal es el NAS, que ocurre en el 55-94% de los casos, en menor o mayor grado, y que debido a la corta vida media de la HER (4-6 horas) la mayoría de los recién nacidos lo sufren ya en las primeras 24 horas<sup>55</sup>. Entre los síntomas observados están: fiebre, estornudos, temblor, irritabilidad, diarrea, vómitos, llanto continuo y, ocasionalmente, convulsiones.

La retirada de los opiáceos no es recomendable antes de las 14 semanas de gestación, porque se asocia con un mayor riesgo de aborto, y tampoco después de las 32 semanas, porque aumenta el estrés. El uso de metadona en los programas de mantenimiento de las adictas a opiáceos durante la gestación ha sido controvertido ya que aunque comporta importantes ventajas para la madre, y no se asocia con un incremento de muerte fetal, produce un síndrome de abstinencia que puede ser más severo y prolongado (puede durar hasta varias semanas) que el provocado por la HER. Los hijos de las madres en programas de mantenimiento con metadona, también son más pequeños que los de madres no adictas, pero significativamente mayores que los hijos de madres que consumen HER. También se ha asociado la exposición a opiáceos con un mayor riesgo de muerte súbita del lactante<sup>55</sup>.

### **3.4.2.3 ALTERACIONES DEL DESARROLLO Y LA CONDUCTA**

En cuanto a los efectos sobre el comportamiento y la capacidad intelectual, los datos son contradictorios. Ciertos estudios longitudinales limitados indican que tanto los niños expuestos a la HER como los expuestos a la metadona parecen tener un normal desarrollo mental y motor en el momento de iniciar su escolarización, mientras que otros encuentran diferencias en el comportamiento y cierto retraso en el desarrollo psicomotor. Los pocos datos existentes sobre los efectos a largo plazo sugieren que los niños expuestos a narcóticos tienen una elevada incidencia de alteraciones del comportamiento y problemas de aprendizaje, y se especula que la exposición intraútero a estas sustancias podría promover una mayor vulnerabilidad a un ambiente adverso. Estudios en animales de experimentación han encontrado una mayor vulnerabilidad en individuos de sexo masculino, y la correlación entre la exposición temprana a la metadona y las anormalidades del comportamiento en ratas macho adultas. Sin embargo, el componente genético y el entorno social postnatal pueden contribuir, de modo determinante, en la manifestación de estos efectos de los opiáceos<sup>55</sup>.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Frank DA, Zuckerman BS, Amaro H, Aboagye K, Bauchner H, Cabral H, Fried L, Hingson R, Kayne H, Levenson SM, Parker S, Reece H, Vinci R. Cocaine use during pregnancy: prevalence and correlates. *Pediatrics* 82(6) (1988) 888-895.
2. Chasnoff IJ, Landress HJ, Barrett ME. The prevalence of illicit-drug or alcohol use during pregnancy and discrepancies in mandatory reporting in Pinellas County, Florida. *N Engl J Med* 322(17) (1990) 1202-1206.
3. Gillogley KM, Evans AT, Hansen RL, Samuels SJ, Batra KK. The perinatal impact of cocaine, amphetamine, and opiate use detected by universal intrapartum screening. *Am J Obstet Gynecol* 163(5 Pt 1) (1990) 1535-1542.
4. Matera C, Warren WB, Moomjy M, Fink DJ, Fox HE. Prevalence of use of cocaine and other substances in an obstetric population. *Am J Obstet Gynecol* 163(3) (1990) 797-801.
5. Ney JA, Dooley SL, Keith LG, Chasnoff IJ, Socol ML. The prevalence of substance abuse in patients with suspected preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 162(6) (1990) 1565-1567.
6. Polzin WJ, Kopelman JN, Brady K, Read JA. Screening for illicit drug use in a military obstetric population. *Obstet Gynecol* 78(4) (1991) 600-601.
7. Schutzman DL, Frankenfield-Chernicoff M, Clatterbaugh HE, Singer J. Incidence of intrauterine cocaine exposure in a suburban setting. *Pediatrics* 88(4) (1991) 825-827.
8. Ostrea EM Jr, Brady M, Gause S, Raymundo AL, Stevens M. Drug screening of newborns by meconium analysis: a large-scale, prospective, epidemiologic study. *Pediatrics* 89(1) (1992) 107-113.
9. Ostrea EM Jr, Lizardo E, Tanafranca M. The prevalence of illicit drug exposure in infants in the NICU as determined by meconium drug screen: Its medical and economic impact. *Pediatr Res* 31(4 Pt 2) (1992) 215A.
10. Sloan LB, Gay JW, Snyder SW, Bales WR. Substance abuse during pregnancy in a rural population. *Obstet Gynecol* 79(2) (1992) 245-248.
11. Burke MS, Roth D. Anonymous cocaine screening in a private obstetric population. *Obstet Gynecol* 81(3) (1993) 354-356.

12. Rosengren SS, Longobucco DB, Bernstein BA, Fishman S, Cooke E, Bactor F, Lewis SC. Meconium testing for cocaine metabolite: prevalence, perceptions, and pitfalls. *Am J Obstet Gynecol* 168(5) (1993) 1449-1456.
13. Schulman M, Morel M, Karmen A, Chazotte C. Perinatal screening for drugs of abuse: reassessment of current practice in a high-risk area. *Am J Perinatol* 10(5) (1993) 374-377.
14. Vaughn AJ, Carzoli RP, Sanchez-Ramos L, Murphy S, Khan N, Chiu T. Community-wide estimation of illicit drug use in delivering women: prevalence, demographics, and associated risk factors. *Obstet Gynecol* 82(1) (1993) 92-96.
15. Vega WA, Kolody B, Hwang J, Noble A. Prevalence and magnitude of perinatal substance exposures in California. *N Engl J Med* 329(12) (1993) 850-854.
16. Welch E, Fleming LE, Peyser I, Greenfield W, Steele BW, Bandstra ES. Rapid cocaine screening of urine in a newborn nursery. *J Pediatr* 123(3) (1993) 468-470.
17. Forman R, Klein J, Barks J, Mehta D, Greenwald M, Einarson T, Koren G. Prevalence of fetal exposure to cocaine in Toronto, 1990-1991. *Clin Invest Med* 17(3) (1994) 206-211.
18. Klitsch M. Prenatal exposure to tobacco, alcohol or other drugs found for more than one in 10 California newborns. *Fam Plan Perspect* 26(2) (1994) 95-96.
19. Kokotailo PK, Langhough RE, Cox NS, Davidson SR, Fleming MF. Cigarette, alcohol and other drug use among small city pregnant adolescents. *J Adolesc Health* 15(5) (1994) 366-373.
20. Pegues DA, Engelgau MM, Woernle CH. Prevalence of illicit drugs detected in the urine of women of childbearing age in Alabama public health clinics. *Public Health Rep* 109(4) (1994) 530-538.
21. Ryan RM, Wagner CL, Schultz JM, Varley J, DiPreta J, Sherer DM, Phelps DL, Kwong T. Meconium analysis for improved identification of infants exposed to cocaine in utero. *J Pediatr* 125(3) (1994) 435-440.
22. Bibb KW, Stewart DL, Walker JR, Cook VD, Wagener RE. Drug screening in newborns and mothers using meconium samples, paired urine samples, and interviews. *J Perinatol* 15(3) (1995) 199-202.
23. Lewis D, Moore C, Leikin JB, Kechavarz L. Multiple birth concordance of street drug assays of meconium analysis. *Vet Hum Toxicol* 37(4) (1995) 318-319.

24. Miller JM Jr, Boudreaux MC, Regan FA. A case-control study of cocaine use in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 172(1 Pt 1) (1995) 180-185.
25. Brown HL, Hiatt AK, Gith SI. Illicit drug use by pregnant women in metropolitan, medium sized, and rural counties using meconium sampling. *Acta Diabetol Lat* 176 (1 part II) (1997) S124.
26. Henderson LO, Powell MK, Hannon WH, Bernert JT Jr, Pass KA, Fernhoff P, Ferre CD, Martin L, Franko E, Rochat RW; Brantley MD, Sampson E. An evaluation of the use of dried blood spots from newborn screening for monitoring the prevalence of cocaine use among childbearing women. *Biochem Mol Med* 61(2) (1997) 143-151.
27. O'Connor TA, Bondurant HH, Siddiqui J. Targeted perinatal drug screening in a rural population. *J Matern Fetal Med* 6(2) (1997) 108-110.
28. Vega WA, Kolody B, Hwang J, Noble A, Porter PA. Perinatal drug use among immigrant and native-born Latinas. *Subst Use Misuse* 32(1) (1997) 43-62.
29. Koren G, Klein J, McMartin K. Diagnosing intrauterine exposure to cocaine by hair testing: six years of clinical use. *Ther Drug Monit* 20(5) (1998) 478-480.
30. Markovic N, Ness RB, Cefilli D, Grisso JA, Stahmer S, Shaw LM. Substance use measures among women in early pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 183(3) (2000) 627-632.
31. Lester BM, ElSohly M, Wright LL, Smeriglio VL, Verter J, Bauer CR, Shankaran S, Bada HS, Walls HH, Huestis MA, Finnegan LP, Maza PL. The maternal lifestyle study: drug use by meconium toxicology and maternal self-report. *Pediatrics* 107(2) (2001) 309-317.
32. Azadi A, Dildy GA 3rd. Universal screening for substance abuse at the time of parturition. *Am J Obstet Gynecol* 198(5) (2008) e30-e32.
33. Mitsuhiro SS, Chalem E, Barros MC, Guinsburg R, Laranjeira R. Prevalence of cocaine and marijuana use in the last trimester of adolescent pregnancy: socio-demographic, psychosocial and behavioral characteristics. *Addict Behav* 32(2) (2007) 392-397.
34. Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías. El problema de la drogodependencia en Europa. Informe anual 2009. Luxemburgo, 2009.
35. Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías. El problema de la drogodependencia en Europa. Informe anual 2006. Luxemburgo, 2006.

36. Dahlem P, Bucher HU, Cuendet D, Mieth D, Gautschi K. Prevalence of drugs in meconium. *Monatsschr Kinderheilkd* 141(3) (1993) 237-240.
37. Farkas AG, Colbert DL, Erskine KJ. Anonymous testing for drug abuse in an antenatal population. *Br J Obstet Gynaecol* 102(7) (1995) 563-565.
38. Sherwood RA, Keating J, Kavvadia V, Greenough A, Peters TJ. Substance misuse in early pregnancy and relationship to fetal outcome. *Eur J Pediatr* 158(6) (1999) 488-492.
39. Sanaullah F, Gillian M, Lavin T. Screening of substance misuse during early pregnancy in Blyth: an anonymous unlinked study. *J Obstet Gynaecol* 26(3) (2006) 187-190.
40. Williamson S, Jackson L, Skeoch C, Azzim G, Anderson R. Determination of the prevalence of drug misuse by meconium analysis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 91(4) (2006) F291-F292.
41. Chiarotti M, Strano-Rossi S, Offidani C, Fiori A. Evaluation of cocaine use during pregnancy through toxicological analysis of hair. *J Anal Toxicol* 20(7) (1996) 555-558.
42. Fundarò C, Genovese O, Rendeli C, Valeri S, De Turris PL, Girlando P, Parenti D, Auriti C, Rossodivita A, Reynaud G, Segni G. Detection of occult fetal exposure to illicit drugs by meconium analysis. *Rivista Italiana di Pediatria* 24(3) (1998) 421-426.
43. Gerola O, Montagna M, Vignali C, Cerri C, Pistorio A, Di Mario M, Spinillo A, Rondini G. Evaluation of gestational exposure to opiates and cocaine by meconium analysis. *Rivista Italiana di Pediatria* 25(6) (1999) 1073-1077.
44. Observatorio Español sobre Drogas (OED). Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas (DGPNSD). Informe 2007. Situación y tendencias de los problemas de drogas en España.
45. Martinez Crespo JM, Antolín E, Comas C, Coll O, Marqués JM, Gual A, Fortuny A. The prevalence of cocaine abuse during pregnancy in Barcelona. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 56(3) (1994) 165-167.
46. Pichini S, Puig C, Zuccaro P, Marchei E, Pellegrini M, Murillo J, Vall O, Pacifici R, García-Algar O. Assessment of exposure to opiates and cocaine during pregnancy in a Mediterranean city: preliminary results of the "Meconium Project". *Forensic Sci Int* 153(1) (2005) 59-65.

47. García Algar O, Vall Combelles O, Puig Sola C, Mur Sierra A, Scaravelli G, Pacifici R, Monleón Getino T, Pichini S. Exposición prenatal a drogas de abuso a través del análisis de meconio en una población de bajo nivel socioeconómico en Barcelona. *An Pediatr* 70(2) (2009) 151-158.
48. Villanueva LA. El embarazo desde una perspectiva farmacológica. *Rev Hosp Gral Dr M Gea González* 4(1-2) (2001) 32-38.
49. Szeto HH. Maternal-fetal pharmacokinetics: Summary and future directions. *NIDA Res Monogr* 154 (1995) 203-217.
50. Fabro S, Scialli AR. Drug and chemical action in pregnancy: pharmacological and toxicologic principles. Nueva York, Marcel Dekker, 1986, 103-113.
51. Fabro S, Scialli AR. Drug and chemical action in pregnancy: pharmacological and toxicologic principles. Nueva York, Marcel Dekker, 1986, 153-163.
52. Miller RK, Kellogg CK. The pharmacodynamics of prenatal chemical exposure. *NIDA Res Monogr* 60 (1985) 39-57.
53. Brody TM, Larner J, Minneman KP. Human pharmacology: molecular to clinical. San Luis, Mosby, 1993, 843-854.
54. Gleicher N. Medicina clínica en obstetricia. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana, 1989, 110-125.
55. Cruz Landeira A, Bouzas Montero CA, Concheiro Guisán M, De Castro Ríos A, Quintela Jorge O, Bermejo Barrera AM, Pereiro Gómez C. Drogas y teratogenia. *Adicciones* 18(1) (2006) 245-258.
56. Szeto HH. Kinetics of drug transfer to the fetus. *Clin Obstet Gynecol* 36(2) (1993) 246-254.
57. Schuetze P, Eiden R, Coles C. Prenatal cocaine and other substance exposure: Effects on infant autonomic regulation at 7 months of age. *Dev Psychobiol* 49 (2007) 276-289.
58. Tapia J, Ventura P. Manual de neonatología. Santiago de Chile, Mediterráneo, 2000.
59. Simone C, Derewlany LO, Oskamp M, Knie B, Koren G. Transfer of cocaine and benzoylecgonine across the perfused human placental cotyledon. *Am J Obstet Gynecol* 170(5 Pt 1) (1994) 1404-1410.

60. Green TP, O'Dea RF, Mirkin BL. Determinants of drug disposition and effect in the fetus. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 19 (1979) 285-322.
61. Krauer B, Dayer P, Anner R. Changes in serum albumin and alpha 1-acid glycoprotein concentrations during pregnancy: an analysis of fetal-maternal pairs. *Br J Obstet Gynaecol* 91(9) (1984) 875-881.
62. Pelkonen O. Biotransformation of xenobiotics in the fetus. *Pharmacol Ther* 10(2) (1980) 261-281.
63. Dvorchik BH, Woodward G, Sitar DS, Tweed WA. Hidroxylation and glucuronidation of various xenobiotics by hepatic microsomes from the fetal lamb, pregnant ewe and human fetus. *Dev Pharmacol Ther* 9(4) (1986) 282-289.
64. Bibbo M, Gill WB, Azizi F, Blough R, Fang VS, Rosenfield RL, Schumacher GF, Sleeper K, Sonek MG, Wied GL. Follow-up study of male and female offspring of DES- exposed mothers. *Obstet Gynecol* 49(1) (1977) 1-8.
65. Burchell B, Coughtrie M, Jackson M, Harding D, Fournel- Gigleux S, Leahey J, Hume R. Development of human liver UDP-glucuronosyltransferases. *Dev Pharmacol Ther* 13(2-4) (1989) 70-77.
66. Rudolph AM. Pharmacodynamics in the maternal-fetal-placental unit. *NIDA Res Monogr* 154 (1995) 163-174.
67. Briggs GG, Freeman RK, Yaffe SJ. *Drugs in pregnancy and lactation*. Baltimore, Lippincott Williams and Wilkins, 1994.
68. Echevarría J. Drogas en el embarazo y morbilidad neonatal. *An Pediatr* 5(6) (2003) 519-522.
69. Behnke M, Eyler FD, Garvan CW, Wobie K. The search for congenital malformations in newborns with fetal cocaine exposure. *Pediatrics* 107(5) (2001) E74.
70. Chiriboga CA, Brust JC, Bateman D, Hauser WA. Dose-response effect of fetal cocaine exposure on newborn neurologic function. *Pediatrics* 103(1) (1999) 79-85.
71. Bateman DA, Chiriboga CA. Dose-response effect of cocaine on newborn head circumference. *Pediatrics* 106(3) (2000) E33.

- 
72. Lizasoain I, Moro MA, Lorenzo P. Cocaína: aspectos farmacológicos. *Adiciones* 14(1) (2002) 57-64.
73. Chavkin W. Cocaine and pregnancy - time to look at the evidence. *JAMA* 285(12) (2001) 1626-1628.
74. Chiriboga CA. Neurological correlates of fetal cocaine exposure. *Ann N Y Acad Sci* 846 (1998) 109-125.
75. Frank DA, Augustyn M, Knight WG, Pell T, Zuckerman B. Growth, development, and behavior in early childhood following prenatal cocaine exposure: a systematic review. *JAMA* 285(12) (2001) 1613-1625.
76. Konkol RJ, Murphey LJ, Ferriero DM, Dempsey DA, Olsen GD. Cocaine metabolites in the neonate: potential for toxicity. *J Child Neurol* 9(3) (1994) 242-248.
77. Brown JV, Bakeman R, Coles CD, Platzman KA, Lynch ME. Prenatal cocaine exposure: a comparison of 2-years-old children in parental and nonparental care. *Child Dev* 75(4) (2004) 1282-1295.
78. Chiriboga CA, Kuhn L, Wasserman GA. Prenatal cocaine exposures and dose-related cocaine effects on infant tone and behavior. *Neurotoxicol Teratol* 29(3) (2007) 323-330.
79. Richardson GA, Goldschmidt L, Larkby C. Effects of prenatal cocaine exposure on growth: a longitudinal analysis. *Pediatrics* 120(4) (2007) e1017-e1027.
80. BSID N. Bayley, Manual for the Bayley Scales of Infant Development, Psychological Corporation, New York, 1969.
81. BSID-II N. Bayley, Manual for the Bayley Scales of Infant Development, Psychological Corporation, New York, 1993.
82. Alessandri SM, Bendersky M, Lewis M. Cognitive functioning in 8- to 18- month-old drug-exposed infants. *Dev Psychol* 34(3) (1998) 565-573.
83. Singer LT, Arendt R, Minnes S, Farkas K, Salvator A, Kirchner HL, Kliegman R. Cognitive and motor outcomes of cocaine-exposed infants. *JAMA* 287(15) (2002) 1952-1960.

84. Behnke M, Eyler FD, Garvan CW, Wobie K, Hou W. Cocaine exposure an developmental outcome from birth to 6 months. *Neurotoxicol Teratol* 24(3) (2002) 283-295.
85. Fettaers L, Tronick EZ. Neuromotor development of cocaine-exposed and control infants from birth through 15 months: poor and poorer performance. *Pediatrics* 98(5) (1996) 938-943.
86. Miller-Loncar C, Lester BM, Seifer R, Lagasse LL, Baurer CR, Shankaran S, Bada HS, Wright LL, Smeriglio VL, Bigsby R, Liu J. Predictors of motor development in children prenatally exposed to cocaine. *Neurotoxicol Teratol* 27(2) (2005) 213-220.
87. Smith LM, Chang L, Yonekura ML, Gilbride K, Kuo J, Poland RE, Walot I, Ernst T. Brain proton magnetic resonance spectroscopy and imaging in children exposed to cocaine in utero. *Pediatrics* 107(2) (2001) 227-231.
88. Briggs GG, Freeman RK, Yaffe SJ. *Drugs in pregnancy and lactation*. Filadelfia, Lippincott Williams and Wilkins, 2005.





# Capítulo

# 4

**Introducción:  
Detección de drogas  
en el embarazo**



## Capítulo 4. Introducción: Detección de drogas en el embarazo

<b>4.1</b>	ENTREVISTA MATERNA .....	75
<b>4.1.1</b>	ENTREVISTA RUTINARIA.....	75
<b>4.1.2</b>	ENTREVISTA ESTRUCTURADA .....	76
<b>4.2</b>	ANÁLISIS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS .....	77
<b>4.2.1</b>	MUESTRAS BIOLÓGICAS .....	77
<b>4.2.1.1</b>	SANGRE .....	77
<b>4.2.1.2</b>	ORINA.....	77
<b>4.2.1.3</b>	MECONIO .....	78
<b>4.2.1.4</b>	PELO .....	79
<b>4.2.1.4.1</b>	COMPOSICIÓN .....	79
<b>4.2.1.4.2</b>	INCORPORACIÓN DE DROGAS .....	80
<b>4.2.1.4.3</b>	VENTAJAS Y DESVENTAJAS.....	80
<b>4.2.1.5</b>	LECHE MATERNA .....	81
<b>4.2.1.6</b>	FLUIDO ORAL .....	82
<b>4.2.1.7</b>	SUDOR.....	83
<b>4.2.1.8</b>	LÍQUIDO AMNIÓTICO .....	83
<b>4.2.2</b>	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	84
<b>4.2.2.1</b>	TÉCNICAS DE CRIBADO .....	94
<b>4.2.2.2</b>	TÉCNICAS DE CONFIRMACIÓN .....	95
<b>4.2.2.2.1</b>	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA.....	96
<b>4.2.2.2.2</b>	CROMATOGRAFÍA DE GASES.....	97
<b>4.2.3</b>	PREPARACIÓN Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	122
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125



Dado el ambiente que rodea a la madre embarazada consumidora de drogas, con frecuencia es difícil obtener información fiable sobre el consumo de sustancias tóxicas para el feto, y si se pregunta de forma directa al respecto, puede recibirse una respuesta negativa. Por ello, a menudo la sospecha es clínica, tanto por los síntomas maternos como por los del recién nacido. Sin embargo, para confirmar esta sospecha, el análisis de las matrices biológicas es una fuente muy fiable.

Los métodos usados para determinar el abuso de drogas en una mujer embarazada, o la exposición intrauterina a drogas en un recién nacido, deberían dirigirse no sólo al tipo de droga consumida, sino también a la cantidad, la frecuencia, y la duración de exposición de la droga. Aunque la adquisición de esta información no sea por lo general posible, dos métodos son los más usados: entrevista materna y análisis de muestras biológicas.

## **4.1 ENTREVISTA MATERNA**

La entrevista materna, realizada de forma adecuada, tiene un gran potencial para obtener información sobre el tipo, la cantidad, la frecuencia y la duración del empleo de droga en la madre. Sin embargo, su principal inconveniente es que es una prueba que requiere mucho tiempo y que tiene una sensibilidad muy baja, con un alto porcentaje de falsos negativos. Las dos formas de entrevista materna generalmente usadas son la rutinaria y la estructurada.

### **4.1.1 ENTREVISTA RUTINARIA**

La entrevista rutinaria forma parte de la historia obstétrica, que es obtenida prenatalmente o cuando una mujer embarazada es admitida en una instalación médica. La exactitud de los datos obtenidos por este método depende de la atención fiel a la entrevista. Entrevistas superficiales a menudo muestran baja incidencia en el empleo de droga, mientras que la incidencia aumenta, del triple al quíntuple, si se emplea un protocolo más organizado. De todos modos existen otros muchos elementos que afectan a su exactitud: miedo maternal a las consecuencias de su confirmación; la subestimación del empleo de droga, aún por los que admiten su empleo; y el discomfort físico experimentado por la mujer cuando está embarazada.

#### **4.1.2 ENTREVISTA ESTRUCTURADA**

La entrevista estructurada sigue un patrón más organizado que la entrevista rutinaria, por lo que se considera más exacta. Normalmente se emplea un cuestionario estándar tipo que se pasa en varias ocasiones durante la gestación por la misma persona, creando un ambiente de confianza y proporcionando incentivos. Entre sus inconvenientes están su alto coste (en el caso de proporcionar incentivos económicos) y que requiere mucho tiempo.

Existen problemas metodológicos relacionados con las entrevistas estructuradas, como la medida del empleo de sustancias durante el embarazo<sup>1</sup>. Primero, en la evaluación de la frecuencia y la cantidad del empleo de droga, el fenómeno de memoria en el paciente no puede ser exacto, en particular si las entrevistas son espaciadas en el tiempo. Por ejemplo, una entrevista obtenida al final de cada trimestre con frecuencia reflejará el empleo reciente de droga. Segundo, la frecuencia del empleo de droga a menudo es relatada como constante y, raras veces, refleja la variabilidad en el empleo. Por lo tanto, los efectos principales de los excesos episódicos pueden ser enmascarados. Asimismo, la cantidad del empleo de droga puede reflejar sólo la cantidad "habitual" usada y omitir los episodios de mayor o menor consumo que de costumbre. La potencia del abuso de drogas también varía, y no puede ser evaluada por los medios habitualmente empleados. Tercero, existe también el problema de pacientes que, deliberadamente, falsifican su empleo de droga. En cierta medida, este problema puede ser amortiguado empleando la técnica *bogus pipe-line*, que consiste en explicarle a la mujer, antes de realizar la entrevista, que se verificará la existencia o no de consumo de drogas mediante una prueba de laboratorio muy sensible<sup>2</sup>.

## 4.2 ANÁLISIS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

### 4.2.1 MUESTRAS BIOLÓGICAS

En los últimos años, la evaluación de la exposición intrauterina a drogas de abuso ha sido realizada mediante el análisis de matrices biológicas provenientes del feto o del recién nacido (por ejemplo, sangre, orina, meconio, pelo, fluido gástrico<sup>3-5</sup>, cordón umbilical<sup>6-8</sup>, uñas<sup>9</sup>), de la embarazada o madre lactante (por ejemplo, sangre, orina, cabello, leche materna<sup>10</sup>, fluido oral<sup>11,12</sup>, sudor<sup>13</sup>), o de ambos (placenta<sup>14,15</sup>, líquido amniótico<sup>5,6,16</sup>).

Cada una de estas matrices biológicas tiene unas características diferentes (concentraciones de la droga y sus metabolitos, ventanas de detección, cantidad de muestra disponible, etc.), lo que hace que tengan distinta utilidad.

#### 4.2.1.1 SANGRE

*Ventajas.* (1) No existe posibilidad de adulteración o sustitución por parte del individuo. (2) Es la muestra que mejor correlaciona los niveles de tóxico encontrados con el efecto farmacológico.

*Limitaciones.* (1) La recogida es invasiva y dolorosa. (2) La sangre del cordón umbilical solo es útil para determinar la exposición aguda a las drogas de abuso en el período inmediatamente anterior al parto. (3) La detección de drogas en la sangre materna sólo es útil para detectar el consumo reciente que se produjo en las horas previas a la toma de muestra, y proporciona escasa información sobre la exposición fetal a drogas.

#### 4.2.1.2 ORINA

Durante años, la orina ha sido el fluido biológico más ampliamente empleado en la detección de drogas de abuso en la mujer embarazada o la exposición intrauterina a drogas en el neonato, gracias a sus numerosas *ventajas*: (1) La recogida de la muestra es fácil y no invasiva. (2) El volumen de muestra del que se dispone para el análisis es elevado. (3) Su análisis es sencillo. (4) La concentración de drogas y/o de sus

metabolitos en la orina es elevada, ya que la mayor parte de las drogas se eliminan por vía renal. (5) Los metabolitos en la orina son normalmente estables, especialmente si se congela. (6) El riesgo de falsos positivos es bajo.

Sin embargo, presenta algunas *limitaciones*: (1) Posibilidad de adulteración y sustitución por parte del individuo. (2) Sólo detecta los casos de consumo reciente, la retrospectividad de la prueba no es superior a las 72 h tras el último consumo. (3) El análisis de la orina materna no proporciona información sobre la exposición fetal a drogas. (4) Inestabilidad de algunos compuestos. (5) Baja sensibilidad. (6) El porcentaje de falsos negativos es alto, aumentando a medida que aumenta el tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta la recogida de la muestra.

#### **4.2.1.3 MECONIO**

El meconio es el primer material fecal del recién nacido y normalmente es excretado de 1 a 5 días después del nacimiento. Comienza a formarse entre la duodécima y la decimosexta semanas de gestación y es depósito acumulativo a partir de entonces. Generalmente, representa el contenido intestinal del feto proporcionando una historia de la deglución fetal y la excreción de la bilis, y puede proporcionar una orientación médica sobre la función gastrointestinal. El color es generalmente verde oscuro debido a la presencia de pigmentación de la bilis. Está compuesto fundamentalmente por agua, pero otros componentes principales son: mucopolisacáridos, células epiteliales, lípidos y proteínas, precursores del colesterol y del esteroide, sustancias del grupo sanguíneo, células escamosas, ácidos y sales de la bilis y líquido amniótico residual<sup>17</sup>.

*Ventajas.* (1) La recogida es fácil y no invasiva. (2) Proporciona una ventana de detección elevada, hasta 20 semanas (segundo y tercer trimestre de gestación). (3) Es metabólicamente inerte, las drogas permanecen estables en el meconio a temperatura ambiente más de 2 semanas. (4) Alta sensibilidad y especificidad.

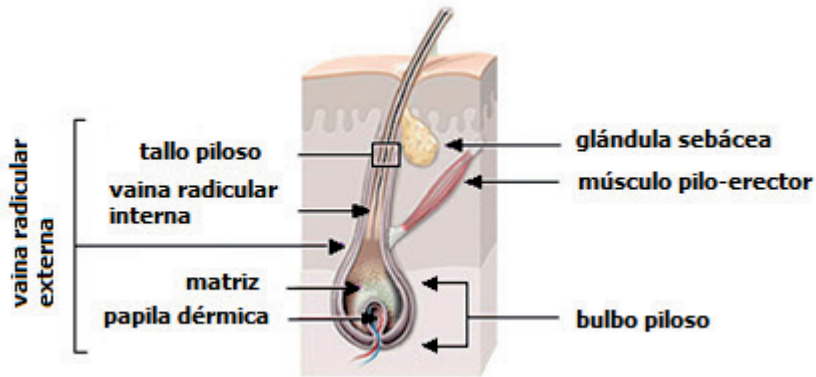


*Limitaciones.* (1) No es una muestra homogénea. (2) La cantidad de muestra obtenida es normalmente pequeña y la concentración de drogas encontrada es baja. (3) Su análisis es laborioso y requiere tiempo. (4) Sólo se detecta a partir del segundo trimestre del embarazo y son las fases precoces del embarazo las que se consideran la etapa crítica para el desarrollo del SNC. (5) Alto porcentaje de falsos negativos.

#### 4.2.1.4 PELO

##### 4.2.1.4.1 COMPOSICIÓN

El pelo está compuesto de proteínas (65-95%, queratina esencialmente), agua (15-35%), lípidos (1-9%), y minerales (<1%)<sup>17</sup>. El folículo piloso (Figura 4.1) obtiene sus nutrientes a través de los vasos sanguíneos y está compuesto por el bulbo y el tallo piloso. El bulbo piloso tiene forma de cebolla y consta de una cavidad en la cual está incluida la papila dérmica, además contiene a la matriz pilosa. El tallo piloso está compuesto, a su vez, por médula, corteza y cutícula. La vaina radicular externa rodea por completo el folículo piloso y, junto con la vaina interna, aseguran el tallo piloso en el folículo. La glándula sebácea está situada en el folículo superior al igual que los músculos erectores del pelo.



**Figura 4.1.** Folículo piloso.

#### 4.2.1.4.2 INCORPORACIÓN DE DROGAS

Aunque no está totalmente clarificado el mecanismo de incorporación de drogas a la matriz del pelo, se proponen distintas posibilidades:

- Difusión pasiva de la droga desde la sangre a las células en crecimiento en el folículo piloso o durante la formación del tallo piloso.
- Difusión de las glándulas sudoríparas ó sebáceas.
- Contaminación externa ambiental sobre el pelo definitivo<sup>18</sup>.

Las drogas y/o sus metabolitos son distribuidos a lo largo del cuerpo del pelo básicamente por difusión pasiva desde la sangre. La distribución de drogas a través de las membranas celulares es facilitada, generalmente, por la alta solubilidad lipídica, baja unión a proteínas y factores físico-químicos, como la forma no ionizada de las drogas en la sangre. La difusión de drogas desde los capilares de la sangre arterial a las células de la matriz en la base del folículo piloso, es considerada la causa principal de deposición de drogas en el pelo que presumiblemente se unen a pigmentos y otros componentes de la matriz.

#### 4.2.1.4.3 VENTAJAS Y DESVENTAJAS

*Ventajas.* (1) La recogida es fácil y no invasiva. (2) Detecta el consumo retrospectivamente durante un largo período de tiempo. En los casos en los que el pelo es suficientemente largo, puede proporcionar la historia de consumo de todo el embarazo. En el caso del pelo del recién nacido la detección del consumo se reduce a los 4 últimos meses de embarazo (tercer trimestre) que es cuando el pelo comienza a crecer. (3) Metabólicamente inerte. (4) Elevada sensibilidad y especificidad. (5) El riesgo de falsos negativos es bajo.

*Limitaciones.* (1) La cantidad de muestra de la que se dispone para el análisis es pequeña, y en algunas ocasiones nula, particularmente en recién nacidos. (2) Los tratamientos cosméticos dificultan el análisis. (3) La cantidad de droga incorporada al pelo varía en función de factores individuales como el color, el tipo o el grosor del pelo. (4) El análisis es caro y requiere tiempo. (5) No detecta consumos muy recientes debido a que el pelo crece lentamente. (6) Riesgo de falsos positivos, seguramente debido a la exposición pasiva del pelo a drogas presentes en el ambiente formando parte del humo o en forma de partículas en el aire o la ropa.

#### **4.2.1.5 LECHE MATERNA**

La mama de la mujer consta de 15-20 lóbulos de glándulas secretoras de leche, incrustados en el tejido graso. Durante el embarazo, los estrógenos y la progesterona, secretados en el ovario y la placenta, hacen que las glándulas productoras de leche se desarrollen y se activen. Los conductos de estas glándulas tienen su desembocadura en el pezón, y en la mitad del embarazo, las glándulas mamarias están preparadas para la secreción. El calostro, el líquido de color blanco amarillento previo a la leche materna, puede emitirse de los pezones durante el último trimestre del embarazo. El pH de calostro se asemeja más al del plasma. Esta diferencia en la composición y el pH puede influenciar el contenido de drogas. Este líquido, que es una fuente rica de proteínas, grasas, hidratos de carbono y anticuerpos, se sustituye por la leche materna al cabo de 3 días del nacimiento. Proteínas, azúcares y lípidos en la leche proporcionan el alimento inicial para el recién nacido. La producción de entre 600 y 1000 ml de leche al día por las células secretoras de leche es estimulada por la hormona pituitaria, la prolactina. La contracción de las células mioepiteliales que rodean los alvéolos permite que la leche se emita en el sistema de conductos<sup>17</sup>.

*Ventajas.* (1) Se pueden determinar un elevado número de drogas. (2) Se puede determinar la exposición a drogas tanto materna como neonatal<sup>17</sup>.

*Limitaciones.* (1) La recogida es difícil (se necesita una bomba) e invasiva. (2) El elevado contenido en lípidos presente en la leche materna puede interferir o disminuir la eficacia de la extracción o recuperación de algunas drogas. (3) Pueden requerirse etapas adicionales de lavado con disolventes no polares para eliminar el exceso de lípidos antes

del análisis cromatográfico. (4) El efecto de los agentes emulsificantes naturales de la leche materna pueden interferir con las reacciones antígeno-anticuerpo que tienen lugar en los *screening* mediante inmunoensayos. (4) La disposición de las drogas varía con la composición de la leche materna. (5) La composición de la leche materna varía diariamente, con el método de muestreo y con la alimentación<sup>17</sup>.

#### **4.2.1.6 FLUIDO ORAL**

La saliva es el término que se usa para describir el líquido excretado por las más de 14 glándulas salivares. Cuando una mezcla de la saliva de las diversas glándulas es recolectada, por expectoración o mediante la colocación de colectores absorbentes en la boca, la muestra resultante se denomina fluido oral. Ésta puede contener sangre, linfa, líquido cervicular y las células de las encías y las mejillas, además de la saliva mixta. La saliva está compuesta de agua (99%), proteínas (0,7%, en gran parte amilasa) y mucinas (0,26%).

*Ventajas.* (1) La recogida es fácil y no invasiva. (2) La probabilidad de adulteración es baja.

*Limitaciones.* (1) Posibilidad de contaminación debido a la ingesta oral de la droga. (2) El método de recogida de la muestra puede afectar al pH de la saliva. Al aumentar el flujo de saliva, la concentración del ión bicarbonato aumenta, por lo que aumenta el pH, y como consecuencia, se puede modificar la concentración de la droga en la misma. (3) Tamaño de muestra limitado. (4) Bajas concentraciones de droga. (5) La detección de drogas en la saliva de la madre sólo es útil para detectar el consumo agudo que se produjo en las horas previas a la recogida de la muestra, proporcionando escasa información sobre la exposición intrauterina a drogas.

#### 4.2.1.7 SUDOR

Es el producto de secreción de las glándulas sudoríparas de la piel. Es un líquido incoloro, límpido, ligeramente salado, que surge en forma de minúsculas gotas de la superficie cutánea, sobre todo de ciertas regiones (axilas, ingles, frente, manos, pies, etc.) cuando la temperatura interna del organismo se eleva por encima de lo normal, ya sea por fiebre, por intensa fatiga física, o a consecuencia de un ambiente demasiado caluroso.

Está constituido principalmente por agua (98-99%) y el 1-2% restante está formado por diversas sustancias que provienen del metabolismo orgánico: cloruro sódico (que confiere al sudor un ligero gusto salado), urea, ácido úrico, creatinina, ácidos grasos, ácido láctico (producto de la fatiga muscular, y por lo tanto, más abundante en el sudor producido en la fatiga intensa), sulfatos, lactatos, etc.

*Ventajas.* (1) La recogida es fácil y no invasiva. (2) Baja probabilidad de sustitución o adulteración.

*Limitaciones.* (1) Bajas concentraciones de droga. Se requiere una alta cantidad de muestra para que las concentraciones de droga sean medibles. (2) El análisis del sudor materno solamente demuestra consumo reciente de droga, proporcionando escasa información sobre la exposición de drogas al feto.

#### 4.2.1.8 LÍQUIDO AMNIÓTICO

El líquido amniótico, producido por las células de la membrana más interna del saco amniótico, es el líquido que rodea y protege al embrión durante el embarazo. Este líquido amortigua al feto contra la presión de los órganos internos y de los movimientos de la madre. La producción del líquido comienza en la primera semana después de la concepción, y aumenta en forma constante hasta la décima semana, después de la cual el volumen de fluido aumenta rápidamente. El líquido amniótico alcanza alrededor de 1,5 L a los 9 meses, contiene células y grasa que pueden dar al líquido un aspecto ligeramente turbio. La concentración de proteínas y el pH del líquido varían con la edad gestacional. El líquido amniótico circula constantemente, siendo tragado por el feto, procesado, absorbido, y excretado por los riñones del feto a tasas altas (50 ml/h). Esta

circulación de líquido expone continuamente al feto a compuestos que pueden ser absorbidos en el intestino o difundidos a través de la piel fetal en la fase inicial del desarrollo. La inmersión del feto en este líquido puede prolongar la exposición a las drogas nocivas y metabolitos<sup>17</sup>.

*Ventajas.* (1) Prácticamente no requiere preparación de la muestra. (2) Útil para determinar la exposición intrauterina a drogas en la fase temprana del desarrollo. (3) Presenta relativamente pocas interferencias. (4) Es compatible con la mayoría de técnicas analíticas.

*Limitaciones.* (1) La recogida es sumamente invasiva, requiere anestesia local, personal médico altamente cualificado, etc. (2) Riesgo de complicación asociado con el muestreo. (3) Tamaño de muestra limitado.

#### **4.2.2 MÉTODOS ANALÍTICOS**

Existen dos tipos de métodos analíticos para determinar la exposición del feto a sustancias tóxicas durante el embarazo: las técnicas de cribado o *screening* y las técnicas de confirmación. Los distintos métodos analíticos que normalmente se usan en la detección de los analitos estudiados durante el embarazo, se resumen por orden cronológico en la Tabla 4.1. Se ha centrado la búsqueda bibliográfica en las matrices biológicas convencionales (sangre y orina) y en las utilizadas en esta Tesis (pelo y meconio).

**Tabla 4.1.** Revisión bibliográfica de las técnicas analíticas usadas para la detección de COC, BE, COD, MOR y 6-MAM durante el embarazo en muestras de sangre, orina, pelo y meconio (COC: cocaína y/o BE, OPI: COD, MOR y/o 6-MAM, RN: Recién nacido, M: Madre y F: Feto).

REF	COMP	MUESTRA	SCREENING	CONF
Ostrea <sup>19</sup>	OPI	Meconio	Inmunoensayo	-
Otras muestras analizadas: Tejidos biológicos F, fluido amniótico.				
Oro <sup>20</sup>	COC OPI	Orina M	TLC	Inmunoensayo enzimático GLC Espectroscopía UV
		Orina RN	EIA	
Otros compuestos analizados: Anfetaminas, otros opioides.				
Ostrea Jr <sup>21</sup>	OPI COC	Meconio	RIA	-
Otras matrices analizadas: Intestino RN. Otros compuestos analizados: Cannabinoides.				
Parton <sup>22</sup>	COC	Orina RN	Inmunoensayo	-
		Pelo RN	-	RIA
Frank <sup>23</sup>	COC	Orina M	EMIT	GC-MS
Otros compuestos analizados: Cannabinoides.				
Halstead <sup>24</sup>	OPI COC	Orina M/RN	TLC EMIT GC-MS	-
Otros compuestos analizados: Benzodiacepinas, Cannabinoides, PCP.				
Ostrea Jr <sup>25</sup>	OPI COC	Meconio	RIA	-
Graham <sup>26</sup>	COC	Pelo M	RIA	-
Osterloh <sup>27</sup>	COC OPI	Orina M/RN	EMIT	-
Otros compuestos analizados: Benzodiacepinas, Salicilato, Fenotiazina, Antidepresivos, Antihistamínicos, Analgésicos narcóticos, Xantina, Anfetaminas, Sedantes, Alcohol.				
Ostrea Jr <sup>28</sup>	COC OPI	Orina RN	TD <sub>x</sub> (FPIA) RIA	-
		Meconio	RIA	-
Otros compuestos analizados: Cannabinoides.				
Chasnoff <sup>29</sup>	OPI COC	Orina M	EMIT	EMIT
Otros compuestos analizados: Alcohol, Cannabinoides.				
Clark <sup>30</sup>	COC	Meconio	TD <sub>x</sub> (FPIA) EMIT	GC-MS
Gillogley <sup>31</sup>	COC OPI	Orina M/RN	EMIT	-
Otros compuestos analizados: Anfetaminas.				

REF	COMP	MUESTRA	SCREENING	CONF
<b>Mastrogiannis</b> <sup>32</sup>	COC	Orina RN	FPIA	TLC
	OPI			-
Otros compuestos analizados: Cannabinoides, Otros opioides, Anfetaminas, Barbitúricos, Benzodiacepinas, PCP.				
<b>Matera</b> <sup>33</sup>	COC OPI	Orina M	EMIT	-
Otros compuestos analizados: Otros opioides, Anfetaminas, Barbitúricos, Benzodiacepinas, Etanol, PCP.				
<b>Ostrea Jr</b> <sup>34</sup>	COC OPI	Meconio	RIA	-
		Pelo M	Inmunoensayo	-
Otros compuestos analizados: Cannabinoides.				
<b>Welch</b> <sup>35</sup>	COC	Orina Pelo	RIA	-
<b>Maynard</b> <sup>36</sup>	COC OPI	Orina M/RN	EIA TLC GC-MS	-
		Meconio	Abuscreen (RIA)	
Otros compuestos analizados: Cannabinoides.				
<b>Ostrea Jr</b> <sup>37</sup>	COC OPI	Orina RN	TD <sub>x</sub> (FPIA) RIA	-
		Meconio	RIA	
Otros compuestos analizados: Cannabinoides.				
<b>Polzin</b> <sup>38</sup>	COC OPI	Orina M	FPIA	GC-MS
Otros compuestos analizados: Alcohol, Cannabinoides, Anfetaminas.				
<b>Schutzman</b> <sup>39</sup>	COC	Meconio	Coat-A-Count (RIA)	-
<b>Bandstra</b> <sup>40</sup>	COC	Orina M/RN	-	GC-MS
		Meconio	Abuscreen (RIA) EMIT TD <sub>x</sub> (FPIA) Coat-A-Count (RIA)	-
<b>Browne</b> <sup>41</sup>	COC	Meconio	-	HPLC
<b>Callahan</b> <sup>42</sup>	COC	Orina RN	EMIT	-
		Meconio	TD <sub>x</sub> (FPIA) GC-MS	-
		Pelo M/RN	RIA	-
<b>Clark</b> <sup>43</sup>	COC	Orina RN	EMIT	-
		Meconio	TD <sub>x</sub> (FPIA)	GC-MS
<b>Dahlem</b> <sup>44</sup>	OPI	Meconio	RIA	-
	COC	Orina RN		
Otros compuestos analizados: Otros opioides, Cannabinoides, Barbitúricos.				
<b>Forman</b> <sup>45</sup>	COC	Pelo M/RN	Coat-A-Count (RIA)	-



*Detección de drogas en el embarazo*

REF	COMP	MUESTRA	SCREENING	CONF
Howe <sup>46</sup>	COC	Orina M/RN	EMIT	-
	OPI	Meconio	TD <sub>x</sub> (FPIA)	GC-MS
Otros compuestos analizados: Anfetaminas.				
Kintz <sup>47</sup>	OPI	Pelo RN	AD <sub>x</sub> (FPIA)	GC-MS
	COC			
Otros compuestos analizados: Benzodiazepinas, Anfetaminas, Tabaco.				
Mirochnick <sup>48</sup>	COC	Orina M/RN	EMIT	-
	OPI	Meconio	RIA	
Otros compuestos analizados: Cannabinoides, Anfetaminas, Benzodiazepinas.				
Ostrea Jr <sup>49</sup>	COC	Orina RN	TD <sub>x</sub> (FPIA)	-
	OPI		RIA	
		Meconio	RIA	
Otros compuestos analizados: Cannabinoides.				
Ostrea Jr <sup>50</sup>	OPI	Meconio	RIA	-
	COC			
Otros compuestos analizados: Cannabinoides.				
Ostrea Jr <sup>51</sup>	OPI	Meconio	RIA	-
	COC			
Otros compuestos analizados: Cannabinoides.				
Romero <sup>52</sup>	COC	Meconio	RIA	-
	OPI		EMIT AD <sub>x</sub> (FPIA)	
Otros compuestos analizados: Cannabinoides.				
Sloan <sup>53</sup>	COC	Orina M	COBAS (EIA)	GC-MS
	OPI			
Otros compuestos analizados: Anfetaminas, Barbitúricos, Cannabinoides, PCP, Benzodiazepinas, Alcohol, Tabaco.				
Steele <sup>54</sup>	COC	Orina M/RN	Abuscreen (RIA)	-
		Meconio	TD <sub>x</sub> (FPIA) EMIT ONLINE (KIMS) Coat-A-Count (RIA)	
Varley <sup>55</sup>	COC	Meconio	TD <sub>x</sub> (FPIA)	GC-MS
Abusada <sup>56</sup>	COC	Sangre Plasma Meconio	-	GC-MS
Burke <sup>57</sup>	COC	Orina M	EMIT	GC-MS
DiGregorio <sup>58</sup>	COC	Pelo M	-	GC-MS
Henderson <sup>59</sup>	COC	Manchas sangre RN	Abuscreen (RIA)	GC-MS
Horn <sup>60</sup>	COC	Orina RN	EMIT	-
	OPI			
Otros compuestos analizados: Anfetaminas, Barbitúricos, Benzodiazepinas, PCP, Alcohol.				

REF	COMP	MUESTRA	SCREENING	CONF
<b>Kintz<sup>61</sup></b>	OPI COC	Pelo RN	AD <sub>x</sub> (FPIA)	GC-MS
Otros compuestos analizados: Tabaco, Benzodiazepinas, Anfetaminas.				
<b>Kintz<sup>62</sup></b>	OPI	Pelo RN Orina RN	-	GC-MS
Otros compuestos analizados: Tabaco.				
<b>Lombardero<sup>63</sup></b>	COC	Orina RN Meconio	-	GC-MS
Otras matrices analizadas: Pañales.				
<b>Marques<sup>64</sup></b>	COC	Orina M Pelo M/RN	EMIT RIA	GC-MS -
<b>Montes<sup>65</sup></b>	COC OPI	Meconio	RIA EMIT AD <sub>x</sub> (FPIA)	GC-MS
Otros compuestos analizados: Cannabinoides.				
<b>Moore<sup>66</sup></b>	COC	Orina RN	Inmunoensayo	HPLC
Otras matrices analizadas: Fluido amniótico, sangre cordón, cordón umbilical.				
<b>Murphey<sup>67</sup></b>	COC	Meconio	-	HPLC
<b>Needlman<sup>68</sup></b>	COC OPI	Orina RN Meconio	RIA	-
Otros compuestos analizados: Otros opioides, Anfetaminas, Cannabinoides, Benzodiazepinas.				
<b>Ostrea Jr<sup>69</sup></b>	COC OPI	Meconio	EMIT TD <sub>x</sub> (FPIA)	GC-MS -
Otros compuestos analizados: Cannabinoides, Anfetaminas.				
<b>Ostrea Jr<sup>70</sup></b>	COC OPI	Meconio	Abuscreen (RIA) EMIT	Abuscreen (RIA) AD <sub>x</sub> (FPIA)
Otros compuestos analizados: Cannabinoides.				
<b>Romero<sup>71</sup></b>	COC OPI	Meconio	RIA EMIT AD <sub>x</sub> (FPIA)	-
Otros compuestos analizados: Cannabinoides.				
<b>Rosengren<sup>72</sup></b>	COC	Meconio	TD <sub>x</sub> (FPIA)	GC-MS
<b>Steele<sup>73</sup></b>	COC	Meconio	Abuscreen (RIA) ONLINE (KIMS) EMIT TD <sub>x</sub> (FPIA) Coat-A-Count (RIA)	TLC GC-MS
<b>Vaughn<sup>74</sup></b>	COC OPI	Orina M	TD <sub>x</sub> (FPIA)	TD <sub>x</sub> (FPIA)
Otros compuestos analizados: Cannabinoides, Anfetaminas.				

## Detección de drogas en el embarazo

REF	COMP	MUESTRA	SCREENING	CONF
<b>Vega<sup>75</sup></b>	COC OPI	Orina M	EMIT	GC
Otros compuestos analizados: Alcohol, Anfetaminas, Barbitúricos, Benzodiazepinas, Cannabinoides, Otros opioides, PCP.				
<b>Welch<sup>76</sup></b>	COC	Orina RN	Abuscreen OnTrak (AIA) EMIT	GC-MS
<b>Browne<sup>77</sup></b>	COC	Orina M/RN Meconio	EMIT HPLC	- GC-MS
<b>Casanova<sup>78</sup></b>	COC	Orina M/RN Meconio	-	GC-MS
Otras matrices analizadas: Fluido amniótico.				
<b>DiGregorio<sup>79</sup></b>	COC	Orina M Pelo M/RN Meconio	EMIT -	GC-MS
<b>Franssen<sup>80</sup></b>	OPI	Orina RN Meconio	TD <sub>x</sub> FL <sub>x</sub> (FPIA)	- HPLC-DAD
Otros compuestos analizados: Anfetaminas.				
<b>Grant<sup>81</sup></b>	COC	Pelo M	RIA	-
<b>Johnson<sup>82</sup></b>	COC	Meconio	RIA	
<b>Jortani<sup>83</sup></b>	COC	Orina M/RN	EMIT TD <sub>x</sub> (FPIA)	GC-MS
<b>Klein<sup>84</sup></b>	COC	Pelo RN	RIA	-
Otros compuestos analizados: Tabaco.				
<b>Lewis<sup>85</sup></b>	COC OPI	Meconio Pelo RN/M	AD <sub>x</sub> (FPIA)	GC-MS
Otros compuestos analizados: Anfetaminas, Cannabinoides, PCP.				
<b>Lewis<sup>86</sup></b>	COC	Meconio	TD <sub>x</sub> (FPIA)	GC-MS
<b>Martinez Crespo<sup>87</sup></b>	COC OPI	Orina M	EMIT	-
Otros compuestos analizados: Alcohol.				
<b>Morales<sup>88</sup></b>	OPI	Meconio	RIA	GC-MS
Otros compuestos analizados: Otros opioides.				
<b>Moriya<sup>89</sup></b>	COC OPI	Meconio Orina M/RN	EMIT	GC-MS TLC
Otros compuestos analizados: Anfetaminas, PCP.				
<b>Ostrea Jr<sup>90</sup></b>	COC OPI	Pelo M Meconio	RIA	GC-MS
Otros compuestos analizados: Cannabinoides.				
<b>Ostrea Jr<sup>91</sup></b>	COC OPI	Meconio Pelo M	RIA	- GC-MS
Otros compuestos analizados: Cannabinoides.				

REF	COMP	MUESTRA	SCREENING	CONF
<b>Pegues<sup>92</sup></b>	COC OPI	Orina M	FPIA	FPIA
Otros compuestos analizados: Cannabinoides, Barbitúricos, Anfetaminas.				
<b>Potter<sup>93</sup></b>	COC	Orina RN	RIA	-
		Meconio	-	GC-MS
		Pelo RN/M	RIA	TD-MS
Otros compuestos analizados: Tabaco, Cannabinoides, Anfetaminas.				
<b>Robinson<sup>94</sup></b>	COC	Plasma M/F	-	GC-MS
Otras matrices analizadas: Cerebro M.				
<b>Ryan<sup>95</sup></b>	COC	Orina M/RN Meconio	TD <sub>x</sub> (FPIA)	GC-MS
	OPI	Orina M	EMIT	GC
Otros compuestos analizados: Anfetaminas, Marihuana, Benzodiacepinas.				
<b>Wingert<sup>96</sup></b>	COC	Orina M/RN	EMIT	GC-MS
	OPI	Meconio		
Otros compuestos analizados: Cannabinoides, otros opioides.				
<b>Farkas<sup>97</sup></b>	OPI	Orina M	GLC EMIT	TLC GLC
	COC		GLC FPIA	GLC
Otros compuestos analizados: Barbitúricos, PCP, Otros opioides, Antihistamínicos, Tabaco, Anfetaminas, Benzodiacepinas, Cannabinoides.				
<b>Lewis<sup>98</sup></b>	COC	Orina RN	EMIT	GC-MS
		Meconio	AD <sub>x</sub> (FPIA) KIMS	
<b>Lewis<sup>99</sup></b>	COC	Meconio	FPIA	GC-MS
Otros compuestos analizados: Marihuana, Anfetaminas.				
<b>Mac<sup>100</sup></b>	COC OPI	Meconio	HPLC-UV	GC-MS
Otros compuestos analizados: Descongestivos, Benzodiacepinas, Anfetaminas, Antihistamínicos, Antidepresivos, Antitusivo, Otros opioides, Antipsicótico.				
<b>Mirochnick<sup>101</sup></b>	COC OPI	Meconio Orina M	Abuscreen (RIA)	-
Otros compuestos analizados: Anfetaminas, Benzodiacepinas, Cannabinoides.				
<b>Moore<sup>102</sup></b>	OPI	Meconio	FPIA	GC-MS
Otros compuestos analizados: Otros opioides.				
<b>Moore<sup>103</sup></b>	COC	Meconio	EMIT	-
	OPI		FPIA	GC-MS
Otros compuestos analizados: Cannabinoides, Anfetaminas.				

## Detección de drogas en el embarazo

REF	COMP	MUESTRA	SCREENING	CONF
<b>Moriya<sup>104</sup></b>	COC OPI	Meconio Heces	EMIT	GC-MS
Otros compuestos analizados: Anfetaminas, PCP.				
<b>Vorhees<sup>105</sup></b>	COC	Plasma M	-	HPLC-UV
<b>Westdorp<sup>106</sup></b>	COC	Orina M	Abuscreen OnTrak (AIA)	EMIT GC-NPD TLC
<b>Chiarotti<sup>107</sup></b>	COC	Vello púbico M	RIA	GC-MS
<b>Newel<sup>108</sup></b>	COC OPI	Pelo M	RIA	GC-MS
Otros compuestos analizados: Cannabinoides, Anfetaminas, PCP.				
<b>Oyler<sup>109</sup></b>	COC	Orina M Meconio	EMIT FPIA	- GC-MS
<b>Sampèriz<sup>110</sup></b>	COC OPI	Orina RN Pelo M Meconio	EMIT	GC-MS
Otros compuestos analizados: Cannabinoides, Benzodiacepinas.				
<b>Sosnoff<sup>111</sup></b>	COC	Manchas sangre RN	RIA	LC-MS/MS
<b>Strano-Rossi<sup>112</sup></b>	COC	Pelo RN	Coat-A-Count (RIA)	GC-MS
<b>Birnbach<sup>113</sup></b>	COC	Orina M	Abuscreen OnTrak (AIA)	-
<b>Brown<sup>114</sup></b>	COC OPI	Meconio	FPIA	GC-MS
Otros compuestos analizados: Anfetaminas, Cannabinoides, PCP.				
<b>Henderson<sup>115</sup></b>	COC	Manchas sangre RN	RIA	LC-MS/MS
<b>Lauria<sup>116</sup></b>	COC OPI	Meconio	GC	-
<b>Mirochnick<sup>117</sup></b>	COC OPI	Meconio Orina M	Abuscreen (RIA) EMIT	-
Otros compuestos analizados: Anfetaminas, Benzodiacepinas, Cannabinoides.				
<b>Monga<sup>118</sup></b>	COC	Orina M Suero M	-	GC-MS
<b>Silvestre<sup>119</sup></b>	OPI	Meconio	RIA	-
<b>Ursitti<sup>120</sup></b>	COC	Pelo RN	RIA	-
<b>Vega<sup>121</sup></b>	COC OPI	Orina M	EMIT	GC
Otros compuestos analizados: Anfetaminas, PCP, Cannabinoides, Alcohol.				
<b>Iwersen<sup>122</sup></b>	OPI	Fluidos M/F Pelo M/F	-	GC-MS
Otras matrices analizadas: Tejidos M/RN.				

REF	COMP	MUESTRA	SCREENING	CONF
<b>Ostrea Jr<sup>123</sup></b>	COC OPI	Meconio	HPLC-UV	GC-MS
Otros compuestos analizados: Antihistamínicos, Antidepresivos, Adrenérgicos, Anticonvulsivos, Analgésicos, Anestesia Local, Aditivos comida, Estimulantes, Expectorantes, Antibacteriales, Antiulcerosos, Cardiotónicos, otros opioides.				
<b>ElSohly<sup>124</sup></b>	COC OPI	Meconio	EMIT-ETS TD <sub>x</sub> (FPIA)	GC-MS
Otros compuestos analizados: Otros opioides, Cannabinoides, PCP, Anfetaminas.				
<b>ElSohly<sup>125</sup></b>	COC	Meconio	EMIT	GC-MS
<b>Fischer<sup>126</sup></b>	OPI COC	Orina M	EMIT	-
Otros compuestos analizados: Otros opioides, Benzodiacepinas, Cannabinoides.				
<b>Gerola<sup>127</sup></b>	COC OPI	Meconio	EMIT	GC-MS
<b>Sherwood<sup>128</sup></b>	OPI COC	Orina M	Cobas Mira (EMIT II)	GC
Otros compuestos analizados: Alcohol, Tabaco, Cannabinoides, Otros opioides, Benzodiacepinas, Anfetaminas.				
<b>Wang<sup>129</sup></b>	COC	Sangre M Meconio	-	LC-MS
Otras matrices analizadas: Fluido amniótico, Placenta, Tejidos F.				
<b>Klein<sup>130</sup></b>	COC	Orina RN	Inmunoensayo	-
		Pelo RN	RIA ELISA	GC-MS
<b>Kuhn<sup>131</sup></b>	COC	Pelo M	RIA	-
	COC OPI	Orina M	EMIT	-
Otros compuestos analizados: Barbitúricos, Otros opioides, Anfetaminas, Cannabinoides.				
<b>Markovic<sup>132</sup></b>	COC OPI	Orina M	FPIA	GC-MS
	COC	Pelo M	RIA	-
Otros compuestos analizados: Cannabinoides, Tabaco, Anfetaminas.				
<b>Srinivasan<sup>133</sup></b>	COC	Sangre M	-	LC-MS/MS
Otras matrices analizadas: Fluido amniótico, Placenta, Tejidos F.				
<b>Vorhees<sup>134</sup></b>	COC	Plasma M	-	HPLC-UV
<b>Xia<sup>135</sup></b>	COC	Orina M	EMIT	-
		Meconio	-	LC-MS/MS
<b>Bergin<sup>136</sup></b>	COC	Orina M/RN	EMIT	-
Otros compuestos analizados: Alcohol, Cannabinoides, Tabaco.				

## Detección de drogas en el embarazo

REF	COMP	MUESTRA	SCREENING	CONF
<b>Birnbach</b> <sup>137</sup>	COC OPI	Orina M	OnTrak TesTcup (AIA)	Inmunoensayo enzimático
Otros compuestos analizados: Anfetaminas, Cannabinoides, PCP.				
<b>Cunha</b> <sup>138</sup>	COC	Meconio	TD <sub>x</sub> (FPIA)	-
<b>Lester</b> <sup>139</sup>	COC OPI	Meconio	EMIT	GC-MS
Otros compuestos analizados: Otros opioides, Cannabinoides, Anfetaminas, PCP.				
<b>Ostrea Jr</b> <sup>140</sup>	COC OPI	Meconio Pelo M	RIA	GC-MS
Otros compuestos analizados: Cannabinoides.				
<b>Katikaneni</b> <sup>141</sup>	COC	Pelo RN/M	RIA	GC-MS
<b>Bar-Oz</b> <sup>142</sup>	COC OPI	Pelo RN Meconio	ELISA	GC-MS
Otros compuestos analizados: Cannabinoides, Benzodiacepinas, Otros opioides, Barbitúricos.				
<b>Pichini</b> <sup>143</sup>	OPI COC	Meconio	-	LC-MS
<b>Vinner</b> <sup>144</sup>	OPI	Orina M/RN Meconio	FPIA	GC-MS
	COC	Pelo M/RN	EMIT	-
Otros compuestos analizados: Cannabinoides, Anfetaminas, LSD, Benzodiacepinas, Otros opioides.				
<b>Vinner</b> <sup>145</sup>	OPI COC	Orina M/RN Meconio Pelo M/RN	Inmunoensayo	GC-MS
Otros compuestos analizados: Cannabinoides, Otros opioides.				
<b>Eyler</b> <sup>146</sup>	COC	Sangre cordón	HPLC	GC-MS
		Orina RN Meconio		
		Pelo M	-	
Otras matrices analizadas: Fluido amniótico.				
<b>Pichini</b> <sup>147</sup>	COC	Meconio	-	LC-MS
<b>Pichini</b> <sup>148</sup>	OPI COC	Meconio	-	LC-MS
Otros compuestos analizados: Anfetaminas, otro opioides.				
<b>Montgomery</b> <sup>149</sup>	OPI COC	Meconio	Inmunoensayo	GC-MS
Otros compuestos analizados: Anfetaminas, Cannabinoides, PCP. Otras matrices analizadas: Cordón umbilical.				
<b>Williamson</b> <sup>150</sup>	OPI COC	Meconio	EIA	GC-MS
Otros compuestos analizados: Otros opioides, Benzodiacepinas, Cannabinoides, Anfetaminas.				

REF	COMP	MUESTRA	SCREENING	CONF
<b>Coles<sup>151</sup></b>	OPI	Orina Suero Plasma Sangre Meconio	-	LC-MS/MS
Otros compuestos analizados: Otros opioides.				
<b>Mitsuhiro<sup>152</sup></b>	COC	Pelo M	ELISA	GC-MS
Otros compuestos analizados: Cannabinoides.				
<b>Azadi<sup>153</sup></b>	COC OPI	Orina	TRIAGE TOX (IFA)	-
Otros compuestos analizados: Anfetaminas, Barbitúricos, Cannabinoides, Benzodicepinas, PCP.				
<b>Gray<sup>154</sup></b>	COC OPI	Meconio	-	LC-MS/MS
Otros compuestos analizados: Anfetaminas, Tabaco, Otros opioides.				
<b>García-Algar<sup>155</sup></b>	OPI COC	Meconio	-	LC-MS
Otros compuestos analizados: Anfetaminas, Cannabinoides.				
<b>Marin<sup>156</sup></b>	COC OPI	Meconio	EMIT II	GC-MS LC-MS/MS
			ELISA	-
Otros compuestos analizados: Cannabinoides, Anfetaminas, Otros opioides, PCP, Barbitúricos, Benzodicepinas.				
<b>Falcon<sup>157</sup></b>	COC OPI	Suero M Pelo M	-	GC-MS
Otros compuestos analizados: Cannabinoides, Anfetaminas.				
<b>Gunn<sup>158</sup></b>	COC	Meconio	-	HPLC-MS/MS

#### 4.2.2.1 TÉCNICAS DE CRIBADO

Los inmunoensayos son, con diferencia, las técnicas de cribado o *screening* más comúnmente empleadas en la detección del consumo de drogas en una mujer embarazada o la exposición intrauterina a drogas en un recién nacido. Entre sus *ventajas* están: que no requieren una laboriosa preparación de la muestra a analizar, necesitan poca cantidad de la misma (200 µL) y que son pruebas rápidas. Como *desventajas* se puede destacar que simplemente indican el grupo farmacológico al que pertenece el compuesto (información cualitativa) y no proporcionan información sobre la cantidad, la frecuencia, la duración o el tiempo de último empleo de la droga. Además, en el caso de un resultado positivo, se requiere una confirmación y cuantificación mediante otras técnicas analíticas altamente específicas.



Existen tres procedimientos inmunológicos de uso general: radioinmunoensayo (RIA, *RadioImmunoAssay*), enzimoimmunoensayo (EIA, *EnzimoImmunoAssay*) y fluoroinmunoensayo (IFA, *ImmunoFluoroAssay*). Todos ellos se basan en el mismo principio general, esto es, el fármaco es administrado a un animal de tal modo que éste quede inmunizado y produzca anticuerpos contra el mismo, y los inmunoensayos se basan en la detección de la reacción entre el anticuerpo y el fármaco. Desgraciadamente, aún usando anticuerpos monoclonales tienen lugar ciertas reacciones cruzadas<sup>159</sup>.

El RIA fue el precursor de los inmunoensayos y ha sido ampliamente utilizado en la detección de drogas en el embarazo, sin embargo, el uso de material radioactivo ha limitado su uso en este y otros campos y a la vez ha popularizado el empleo del EIA y del IFA. La principal técnica de EIA empleada en la detección de drogas en el embarazo, es el inmunoensayo multiplicado por enzimas (EMIT, *Enzyme Multiplied Immunoassay*), aunque en la actualidad está cobrando importancia el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). En cuanto a fluoroinmunoensayos, la técnica más empleada es el inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FPIA, *Fluorescence Polarization ImmunoAssay*).

Los inmunoensayos son usados como técnicas de cribado de un tipo de sustancias determinado. En el caso de realizar un cribado de sustancias desconocidas, algunos autores optan por utilizar técnicas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*), la cromatografía gas-líquido (GLC, *Gas-Liquid Chromatography*) y la cromatografía de gases (GC, *Gas Chromatography*) acoplada a espectrometría de masas (MS, *Mass Spectrometry*) (GC-MS) para realizar el *screening*.

#### 4.2.2.2 TÉCNICAS DE CONFIRMACIÓN

Tal y como se ha explicado en el apartado anterior, un resultado de *screening* positivo debe ser confirmado por un método más específico. En la Tabla 4.1 se puede observar como algunos autores optan por confirmar dichos resultados utilizando el mismo inmunoensayo u otro diferente. Sin embargo, las técnicas de confirmación más comúnmente empleadas son la cromatografía líquida (LC, *Liquid Chromatography*) y la GC acopladas a diferentes tipos de detectores.

#### 4.2.2.2.1 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

La LC clásica se lleva a cabo en una columna, generalmente de vidrio, la cual está rellena con la fase líquida. Luego de colocar la muestra en la parte superior, se hace fluir la fase móvil a través de la columna por efecto de la gravedad. Con objeto de aumentar la eficiencia en las separaciones, el tamaño de las partículas de fase fija se fue disminuyendo, lo cual generó la necesidad de utilizar altas presiones para lograr que la fase móvil fluyera. De esta manera, nació la técnica de HPLC, que requiere de instrumental especial que permita trabajar con las altas presiones requeridas.

Entre las *ventajas* de esta técnica están: (1) Velocidad de análisis. (2) Alta resolución que permite obtener y separar mezclas muy complejas. (3) Resultados cuantitativos. (4) Buena sensibilidad. (5) Automatización. (6) Amplio espectro de aplicaciones.

Sin embargo, también tiene algunas *limitaciones*: (1) Instrumentación costosa. (2) Difícil análisis cualitativo. (3) No existe detector universal y sensible. (4) Elevado coste de operación. (5) Experiencia indispensable.

La HPLC ha sido empleada en la detección de drogas en el embarazo utilizando principalmente detectores como el ultravioleta (UV)<sup>105,134</sup> y el array de diodos<sup>80</sup> (DAD, *Diode Array Detector*).

La LC-MS (Figura 4.2) y su modalidad en tándem (LC-MS/MS) también han sido utilizadas en la detección de drogas en el embarazo. Esta última modalidad ha alcanzando en la actualidad una elevada importancia, siendo cada vez más utilizada como técnica de confirmación. La LC-MS es una técnica superior a la LC con cualquier otro detector, en términos de sensibilidad, especificidad, precisión y exactitud. Sin embargo, cabe mencionar que es una técnica costosa y que su funcionamiento requiere tiempo, experiencia y habilidad.



**Figura 4.2.** Equipo de HPLC (izquierda) acoplado a MS (derecha).

#### 4.2.2.2.2 CROMATOGRAFÍA DE GASES

En GC las sustancias se separan por distribución entre una fase inmobilizada (un sólido o, más frecuentemente un líquido inmobilizado sobre un soporte sólido o sobre las paredes de la columna) y una fase móvil gaseosa. Cuando la fase estacionaria es un sólido, hablamos de cromatografía gas-sólido (GSC, *Gas Solid Chromatography*), mientras que si la fase estacionaria es un líquido, la técnica se denomina GLC.

*Ventajas:* (1) Eficacia elevada como técnica de separación. (2) Técnica no destructiva. (3) Excelente reproducibilidad (referida sobre todo a tiempos de retención). (4) Necesita una cantidad de muestra baja, del orden de  $\mu\text{l}$ .

*Limitaciones:* (1) Campo de aplicación limitado en comparación con la LC. Solamente es aplicable a la separación de compuestos volátiles y semivolátiles, con bajos pesos moleculares (inferiores a 500-600 g/mol), estables a las temperaturas de trabajo, no iónicos y preferentemente con baja polaridad. (3) El equipo es costoso y requiere personal especializado para su utilización e interpretación de los resultados.

La GC ha sido empleada en la detección de COC y opioides en el embarazo asociada a detectores como el nitrógeno-fósforo<sup>106</sup> (NPD, *Nitrogen Phosphorus Detector*), sin embargo, el detector más ampliamente utilizado, con diferencia, ha sido la MS (Figura 4.3).



**Figura 4.3.** Equipo de GC-MS.

La combinación GC-MS constituye una de las herramientas más poderosas en manos de un químico analítico. Proporciona tanto información cualitativa, trabajando en modo de barrido de iones (full SCAN); como cuantitativa, trabajando en modo de monitorización de iones seleccionados (SIM, *Selected Ion Monitoring*), y una gran sensibilidad. El abaratamiento de los sistemas en las últimas décadas ha convertido el GC-MS en un instrumento usual de los laboratorios. Este abaratamiento ha permitido la utilización de sistemas *tándem* MS/MS de sobremesa como detectores de GC por el precio que hace dos décadas suponía acoplar un MS a un cromatógrafo, por lo que la modalidad en *tándem* empieza a ser ampliamente utilizada<sup>160-162</sup>.

En las siguientes tablas (4.2 y 4.3) se describen las condiciones GC-MS y los parámetros de validación de los distintos métodos validados que han sido encontrados en la bibliografía, para la detección de COC, BE, COD, MOR y/o 6-MAM en muestras de pelo y de meconio, respectivamente. Los analitos diferentes a los analizados en esta Tesis no han sido incluidos en esta tabla.

Tabla 4.2. Revisión bibliográfica de los métodos de determinación de COC, BE, COD, MOR y 6-MAM mediante GC-MS en muestras de pelo.

REF	COMP	DIGESTIÓN Y/O EXTRACCIÓN	CONDICIONES GC-MS	RESULTADOS DE VALIDACIÓN
Harkey <sup>163</sup>	COC	Hidrólisis enzimática SPE	Gas portador: He (5 psi, 55 cm/s) Programa temperaturas horno Columna DB-5 (15 m x 0,25 mm x 0,1 µm) Temperatura inyector: 260°C (splitless) Temperatura línea transferencia: 260°C Temperatura manifold: 240°C Fuente ionización: CI (0,16 mA) Voltaje electromultiplicador: 1600V Gas reactivo: Isobutano Rango de masas: 80-440 Velocidad barrido: 1,0 s/scan	$r^2 > 0,992$ (0,1-10 ng/mg) LOD=0,1 ng/mg CV interdía (0,1; 1 ng/g) <18,2% R (0,1; 0,5; 1 ng/mg) >90,4%
	BE			$r^2 > 0,991$ (0,1-10 ng/mg) LOD=0,1 ng/mg CV interdía (0,1; 1 ng/g) <22,2% R (0,1; 0,5; 1 ng/mg) >93,3%
Möller <sup>164</sup>	COC	Hidrólisis enzimática SPE	Gas portador: He (2 mL/min) Programa temperaturas horno Columna HP-Ultra 2 (12 m x 0,2 mm x 0,33 µm) Temperatura inyector: 260°C Temperatura interfase: 280°C Fuente ionización: EI (70eV)	$r^2 = 0,9995$ (0,5-50 ng/mg) LOD=0,1 ng/mg CV (12,2 ng/g)=8% R (5 ng/mg)=90%
	BE			$r^2 = 0,9998$ (0,5-25 ng/mg) LOD=0,1 ng/mg CV (2,8 ng/g)=14% R (5 ng/mg)=75%

REF	COMP	DIGESTIÓN Y/O EXTRACCIÓN	CONDICIONES GC-MS	RESULTADOS DE VALIDACIÓN
<b>Moeller<sup>165</sup></b>	BE			$r^2=0,9999$ (0,5-25 ng/mg) LOD=0,08 ng/mg LOQ=0,13 ng/mg CV (2,8 ng/g)=14% R (5 ng/mg)=90%
	COC		Gas portador: He (2 mL/min) Programa temperaturas horno Columna HP-Ultra 2 (12 m x 0,2 mm x 0,33 $\mu$ m) Temperatura inyector: 260°C Temperatura interfase: 280°C Fuente ionización: EI (70eV)	$r^2=0,9998$ (0,5-25 ng/mg) LOD=0,04 ng/mg LOQ=0,08 ng/mg CV (12,2 ng/mg)=8% R (5 ng/mg)=95%
	COD	Hidrólisis enzimática SPE		$r^2=0,9995$ (0,5-25 ng/mg) LOD=0,04 ng/mg LOQ=0,06 ng/mg CV (1,7 ng/mg)=12% R (5 ng/mg)=80%
	6-MAM			$r^2=0,9998$ (0,5-25 ng/mg) LOD=0,16 ng/mg LOQ=0,3 ng/mg R (5 ng/mg)=70%
	MOR			$r^2=0,9999$ (0,5-25 ng/mg) LOD=0,04 ng/mg LOQ=0,08 ng/mg CV (7,7 ng/mg)=4% R (5 ng/mg)=70%
<b>Edder<sup>166</sup></b>	COD		Gas portador: He (1,1 mL/min) Programa temperaturas horno Columna DB5 (15 m x 0,25 mm x 0,25 $\mu$ m) Temperatura inyector: 270°C (splitless) Temperatura detector: 250°C	$r^2=0,995$ (0,5-2 ng/mg) LOD=0,03 ng/mg LOQ=0,1 ng/mg CV (1,99 ng/mg)=12% $r^2=0,997$ (0,5-2 ng/mg) LOD=0,05 ng/mg LOQ=0,2 ng/mg CV (2,18 ng/mg)=10% $r^2=0,996$ (0,5-2 ng/mg) LOD=0,03 ng/mg LOQ=0,1 ng/mg CV (1,93 ng/mg)=3%
	6-MAM	SFE		
	MOR			

REF	COMP	DIGESTIÓN Y/O EXTRACCIÓN	CONDICIONES GC-MS	RESULTADOS DE VALIDACIÓN
Wang <sup>167</sup>	COC			$r^2 > 0,995$ (0,1-100 ng/mg) LOD=0,1 ng/mg CV interdiía (1, 5, 25 ng/mg) <7,2% Exactitud interdiía (1; 5; 25 ng/mg) >97% R>90%
	BE			$r^2 > 0,995$ (0,1-100 ng/mg) LOD=0,1 ng/mg CV interdiía (1, 5 ng/mg) <10,5% Exactitud interdiía (1; 5; 25 ng/mg) =100% R>90%
	COD	Extracción con metanol SPE	Gas portador: He (1 mL/min) Programa temperaturas horno Columna HP-1 (12 m x 0,2 mm x 0,33 µm) Temperatura inyector: 250°C (splitless; 0,5 min) Temperatura línea transferencia: 280°C Fuente ionización: EI (200 eV)	$r^2 > 0,995$ (0,1-100 ng/mg) LOD=0,1 ng/mg CV interdiía (1, 5 ng/mg) <5,7% Exactitud interdiía (1; 5; 25 ng/mg) >90% R>90%
	MOR			$r^2 > 0,995$ (0,1-100 ng/mg) LOD=0,1 ng/mg CV interdiía (1, 5 ng/mg) <7,0% Exactitud interdiía (1; 5; 25 ng/mg) >90% R>90%
	6-MAM			$r^2 > 0,995$ (0,1-100 ng/mg) LOD=0,1 ng/mg CV interdiía (1, 5 ng/mg) <13,1% Exactitud interdiía (1; 5; 25 ng/mg) >98% R>90%

REF	COMP	DIGESTIÓN Y/O EXTRACCIÓN	CONDICIONES GC-MS	RESULTADOS DE VALIDACIÓN
<b>Cirimele<sup>168</sup></b>	COD		Gas portador: He (1 mL/min) Programa temperaturas horno Columna HP5-MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) Temperatura inyector: 270°C (splitless; 0,75 min)	LOD=0,3 ng/mg CV interdia (9,10-13,3 ng/mg)=13,2% R=61%
	MOR	SFE		LOD=0,2 ng/mg CV interdia (0,45-0,70 ng/mg)=17,4% R=53%
	6-MAM		Fuente ionización: EI (70eV, 180°C) Voltaje electromultiplicador: 400 eV	LOD=0,1 ng/mg CV interdia (9,80-14,9 ng/mg)=14,1% R=96%
<b>Kintz<sup>169</sup></b>	COC		Gas portador: He (1 mL/min) Programa temperaturas horno HP-5 (30 m x 0,25 mm) Temperatura inyector: 260°C (splitless; 0,75 min)	$r^2=0,998$ (0,2-50 ng/mg) LOD=0,05 ng/mg CV interdia (2 ng/mg)=8,4% R (2 ng/mg) =83,2%
	BE	Hidrólisis ácida LLE	Fuente ionización: EI (70eV, 250°C) Voltaje electromultiplicador: 400 eV	$r^2=0,998$ (0,2-50 ng/mg) LOD=0,15 ng/mg CV interdia (2 ng/mg)=14,3% R (2 ng/mg) =72,1%



REF	COMP	DIGESTIÓN Y/O EXTRACCIÓN	CONDICIONES GC-MS	RESULTADOS DE VALIDACIÓN
<b>Kintz<sup>170</sup></b>	MOR			$r^2=0,998$ (0,2-10 ng/mg) LOD=0,10 ng/mg CV interdiía (2 ng/mg)=12% R (2 ng/mg) =79,3%
	COD		Gas portador: He (1,8 mL/min) Programa temperaturas horno EI (70 eV) Columna BP-5 (12 m x 0,22 mm) Temperatura inyector: 260°C (splitless; 1 min) Temperatura fuente: 210-220°C Voltaje electromultiplicador: 1650V	$r^2=0,998$ (0,2-10 ng/mg) LOD=0,10 ng/mg CV interdiía (2 ng/mg)=11,6% R (2 ng/mg) =85,7%
	6-MAM	Hidrólisis ácida LLE		$r^2=0,993$ (0,2-10 ng/mg) LOD=0,25 ng/mg CV interdiía (2 ng/mg)=15,7% R (2 ng/mg) =69,4%
	COC			$r^2=0,998$ (0,2-10 ng/mg) LOD=0,8 ng/mg CV interdiía (2 ng/mg)=17,7% R (2 ng/mg) =68,6%
	BE			$r^2=0,995$ (0,2-10 ng/mg) LOD=0,20 ng/mg CV interdiía (2 ng/mg)=14,3% R (2 ng/mg) =72,1%

REF	COMP	DIGESTIÓN Y/O EXTRACCIÓN	CONDICIONES GC-MS	RESULTADOS DE VALIDACIÓN
Gaillard <sup>171</sup>	COC			LOD=0,19 ng/mg CV intradía (4 ng/mg)<6,7% CV interdía (4 ng/mg)=8,9% MRE (7,0 ng/mg)=7,14% R (4 ng/mg)=86,4%
	BE			LOD=0,14 ng/mg CV intradía (4 ng/mg)<6,7% CV interdía (4 ng/mg)=2,8% MRE (4,0 ng/mg)=2,5% R (4 ng/mg)=91,6%
	COD	Hidrólisis ácida SPE	Gas portador: He (1,3 mL/min) Programa temperaturas horno Tiempo análisis: 24 min Columna CP SIL 8 CB (25 m x 0,25 mm x 0,25 µm) Temperatura inyector: 280°C (splitless) Temperatura detector: 300°C	LOD=0,15 ng/mg CV intradía (4 ng/mg)<6,7% CV interdía (4 ng/mg)=3,8% MRE (2,9 ng/mg)=0,34% R (4 ng/mg)=92,4%
	MOR			LOD=0,12 ng/mg CV intradía (4 ng/mg)<6,7% CV interdía (4 ng/mg)=4,2% MRE (4,3 ng/mg)=0% R (4 ng/mg)=90,7%
	6-MAM			LOD=0,21 ng/mg CV intradía (4 ng/mg)<6,7% CV interdía (4 ng/mg)=7,8% R (4 ng/mg)=88,1%

REF	COMP	DIGESTIÓN Y/O EXTRACCIÓN	CONDICIONES GC-MS	RESULTADOS DE VALIDACIÓN
<b>Hold<sup>172</sup></b>	COC			$r^2 > 0,990$ (0,5-50 ng/mg) LOQ=0,5 ng/mg CV intradía (0,2; 0,5; 5; 50 ng/mg) <5,7% Exactitud intradía (0,2; 0,5; 5; 50 ng/mg) >73% R (0,5; 5,0; 50 ng/mg) >71,0%
	BE		Gas portador: He (8 psi) Programa temperaturas horno Columna DB-1 (30 m x 0,32 mm x 1,0 µm) Temperatura inyector: 285°C Temperatura interfase: 285°C Temperatura línea transferencia: 275°C Temperatura ionizador: 130°C Fuente ionización: PCI (0,16 mA) Gas reactivo: metano-amonía (0,60 torr) Energía electrón: -70eV Dínodo de conversión: -3 KV Voltaje multiplicador: -1500 V	$r^2 > 0,990$ (0,5-25 ng/mg) LOQ=0,5 ng/mg CV intradía (0,2; 0,5; 5; 50 ng/mg) <33% Exactitud intradía (0,2; 0,5; 5; 50 ng/mg) >94% R (0,5; 5,0; 50 ng/mg) >66,4%
	COD	Hidrólisis enzimática SPE		LOQ=0,5 ng/mg CV intradía (0,2; 0,5; 5; 50 ng/mg) <27,9% Exactitud intradía (0,2; 0,5; 5; 50 ng/mg) >96,1% R (0,5; 5,0; 50 ng/mg) >64,4%
	MOR			$r^2 > 0,990$ (0,5-50 ng/mg) LOQ=0,5 ng/mg CV intradía (0,2; 0,5; 5; 50 ng/mg) <27% Exactitud intradía (0,2; 0,5; 5; 50 ng/mg) >92,6% R (0,5; 5,0; 50 ng/mg) > 102,7%
	6-MAM			$r^2 > 0,990$ (0,5-50 ng/mg) LOQ=0,5 ng/mg CV intradía (0,2; 0,5; 5; 50 ng/mg) <16,1% Exactitud intradía (0,2; 0,5; 5; 50 ng/mg) > 106% R (0,5; 5,0; 50 ng/mg) >24,0%

REF	COMP	DIGESTIÓN Y/O EXTRACCIÓN	CONDICIONES GC-MS	RESULTADOS DE VALIDACIÓN
<b>Pichini<sup>173</sup></b>	COC		Gas portador: He (1 mL/min) Programa temperaturas horno Tiempo análisis: 22 min Columna Restek Rtx-5 (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm) Temperatura inyector: 250°C (splitless) Temperatura línea transferencia: 280°C Fuente ionización: EI (20 µA) Temperatura trampa iónica: 200°C Rango masas: 80-500 uma	$r^2=0,994$ (0,02-100 ng/mg) LOQ=0,02 ng/mg MRE (7,3; 7,0 ng/mg) < 11,4%
	BE			$r^2=0,991$ (0,01-50 ng/mg) LOQ=0,01 ng/mg MRE (1,6; 4,0 ng/mg) < 18,7%
	COD	Extracción con metanol		$r^2=0,998$ (0,01-50 ng/mg) LOQ=0,01 ng/mg MRE (6,7; 2,9 ng/mg) < 24,1%
	MOR			$r^2=0,996$ (0,01-50 ng/mg) LOQ=0,01 ng/mg MRE (11,9; 4,3 ng/mg) < 5,88%
	6-MAM			$r^2=0,998$ (0,01-100 ng/mg) LOQ=0,01 ng/mg

REF	COMP	DIGESTIÓN Y/O EXTRACCIÓN	CONDICIONES GC-MS	RESULTADOS DE VALIDACIÓN
<b>Girod<sup>174</sup></b>	COD			$r^2=0,9987$ (1-20 ng/mg) LOD=0,05 ng/mg CV (31,9; 4,2 ng/mg)<7,5% R=95%
	6-MAM		Gas portador: He Programa temperaturas horno Columna DB5MS (15 m x 0,25 mm x 0,25 $\mu$ m) Temperatura inyector: 270°C (splitless) Temperatura interfase: 280°C Temperatura fuente: 200°C	$r^2=0,9979$ (1-20 ng/mg) LOD=0,05 ng/mg CV (26,6; 3,5 ng/mg)<7,9% R=80%
	MOR	Hidrólisis ácida ASPE		$r^2=0,9999$ (1-20 ng/mg) LOD=0,05 ng/mg CV (32,9; 3,5 ng/mg)<6,4% R=103%
	COC			$r^2=0,9984$ (1-20 ng/mg) LOD=0,15 ng/mg CV (41,1; 5,5 ng/mg)<11,6% R=79%
<b>Jones<sup>175</sup></b>	COD		Gas portador: He (1 mL/min) Columna DB-5 (25 m x 0,20 mm x 0,33 mm) Tiempo de análisis: 14,65 min Temperatura inyector: 280°C (splitless) Temperatura línea transferencia: 290°C Fuente ionización: EI (230°C) Temperatura cuadrupolo: 150°C Dwell time: 50 ms	LOD=0,03 ng/mg LLOQ=0,32 ng/mg ULOQ=10 ng/mg CV (1, 4 ng/mg)<9%
	MOR	Hidrólisis ácida SPE		LOD=0,01 ng/mg LLOQ=0,15 ng/mg ULOQ=10 ng/mg CV (1, 4 ng/mg)<11%
	6-MAM			LOD=0,01 ng/mg LLOQ=1,10 ng/mg ULOQ=10 ng/mg CV (1, 4 ng/mg)<18%

REF	COMP	DIGESTIÓN Y/O EXTRACCIÓN	CONDICIONES GC-MS	RESULTADOS DE VALIDACIÓN
Montagna <sup>176</sup>	MOR			$r^2=0,98$ (0-5 ng/mg) LOD=0,01-0,03 ng/mg LOQ=0,02-0,09 ng/mg CV intradía<5,38% CV interdía<11,74%
	6-MAM			$r^2=0,98$ (0-5 ng/mg) LOD=0,01-0,03 ng/mg LOQ=0,02-0,09 ng/mg CV intradía<11,66% CV interdía<25,33%
	COD	Hidrólisis ácida SPE	Gas portador: He (1 mL/min) Programa temperaturas horno Columna HP Ultra 2 (12 m x 0,2 mm; 0,33 $\mu$ m) Temperatura inyector: 250°C Temperatura línea transferencia: 280°C	$r^2=0,98$ (0-5 ng/mg) LOD=0,01-0,03 ng/mg LOQ=0,02-0,09 ng/mg CV intradía<3,02% CV interdía<17,17%
	COC			$r^2=0,98$ (0-5 ng/mg) LOD=0,01-0,03 ng/mg LOQ=0,02-0,09 ng/mg CV intradía<3,59% CV interdía<6,71%
	BE			$r^2=0,98$ (0-5 ng/mg) LOD=0,01-0,03 ng/mg LOQ=0,02-0,09 ng/mg CV intradía<10,13% CV interdía<8,2%

REF	COMP	DIGESTIÓN Y/O EXTRACCIÓN	CONDICIONES GC-MS	RESULTADOS DE VALIDACIÓN
<b>Skender<sup>177</sup></b>	COC			$r^2 > 0,997$ (0,4-16 ng/mg) LOD=0,20 ng/mg CV=16,1% Exactitud: 96,3%
	COD			$r^2 > 0,997$ (0,4-16 ng/mg) LOD=0,10 ng/mg CV=8,2% Exactitud: 100,6%
	HER	Extracción con metanol SPE	Gas portador: He (1 mL/min) Programa temperaturas horno Columna RTX-5 (30 m x 0,25 mm) Temperatura línea transferencia: 260°C	$r^2 > 0,997$ (0,4-16 ng/mg) LOD=0,20 ng/mg CV=12,6% Exactitud: 91,3%
	6-MAM			$r^2 > 0,997$ (0,4-16 ng/mg) LOD=0,05 ng/mg CV=6,5% Exactitud: 98,8%
	MOR			$r^2 > 0,997$ (0,4-16 ng/mg) LOD=0,10 ng/mg CV=6,3% Exactitud: 99,4%

REF	COMP	DIGESTIÓN Y/O EXTRACCIÓN	CONDICIONES GC-MS	RESULTADOS DE VALIDACIÓN
<b>Acampora<sup>178</sup></b>	MOR		Gas portador: He (1 mL/min) Programa temperaturas horno Columna DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) Temperatura interfase: 260°C Inyección en columna	$r^2=0,983$ (0,156-5 ng/mg) LOD=0,003 ng/mg
	COD	Hidrólisis ácida SPE	Fuente ionización: NCI (300 µA, 160°C) Gas reactivo: Metano (1,3 mL/min) Rango masas: 50-800 uma Voltaje excitación: 0,8 V Energía: 0,225	$r^2=0,993$ (0,156-5 ng/mg) LOD=0,005 ng/mg
	6-MAM			$r^2=0,982$ (0,156-5 ng/mg) LOD=0,002 ng/mg
<b>De Toledo<sup>179</sup></b>	COC		Gas portador: He (0,6 mL/min) Programa temperaturas horno Columna HP5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) Temperatura inyector: 250°C Temperatura interfase: 250°C Fuente ionización: EI (70eV)	$r^2=0,989$ (0,1-50 ng/mg) LOD=0,1 ng/mg LOQ= 0,1 ng/mg CV intradía (1, 15, 30 ng/mg)<5,9% CV interdía (1, 15, 30 ng/mg)<9,3% R (1, 15, 30 ng/mg)>74,6%
	BE	Extracción metanol SPME		$r^2=0,991$ (0,1-50 ng/mg) LOD=0,5 ng/mg LOQ= 0,5 ng/mg CV intradía (1, 15, 30 ng/mg)<3,8% CV interdía (1, 15, 30 ng/mg)<5,6% R (1, 15, 30 ng/mg)>90,8%



REF	COMP	DIGESTIÓN Y/O EXTRACCIÓN	CONDICIONES GC-MS	RESULTADOS DE VALIDACIÓN
<b>Romolo<sup>180</sup></b>	COC			$r^2=0,99824$ (0,25-10 ng/mg) LOD=0,05 ng/mg CV interdiá (0,25; 5 ng/mg)<11,2% R=86,3%
	BE		Gas portador: He (0,6 mL/min) Programa temperaturas horno Columna HP-5MS	$r^2=0,98926$ (0,25-10 ng/mg) LOD=0,2 ng/mg CV interdiá (0,25; 5 ng/mg)<11,2% R=89,8%
	MOR	Extracción con tampón SPE	(25 m x 0,20 mm x 0,33 $\mu$ m) Temperatura inyector: 280°C (splitless; 0,7 min) Temperatura línea transferencia: 280°C Fuente ionización: EI (70eV)	$r^2=0,99071$ (0,25-10 ng/mg) LOD=0,05 ng/mg CV interdiá (0,25; 5 ng/mg)<11,2% R=90,1%
	6-MAM			$r^2=0,99283$ (0,25-10 ng/mg) LOD=0,08 ng/mg CV interdiá (0,25; 5 ng/mg)<11,2% R=80,6%
	COD			$r^2=0,99502$ (0,25-10 ng/mg) CV interdiá (0,25; 5 ng/mg)<11,2% R=90,0%
<b>Gentili<sup>181</sup></b>	COC	Extracción ácida HS-SPME	Gas portador: He (0,7 mL/min) Programa temperaturas horno Columna HP-5 (12,5 m x 0,20 mm x 0,33 $\mu$ m) Temperatura inyector: 250°C (splitless) Temperatura línea transferencia: 280°C Fuente ionización: EI (230°C)	$r^2=0,97$ (0,2-8 ng/mg) LOD=0,35 ng/mg LOQ=1,05 ng/mg CV intradiá (2 ng/mg)=7,97% R (2 ng/mg)=101,50%

REF	COMP	DIGESTIÓN Y/O EXTRACCIÓN	CONDICIONES GC-MS	RESULTADOS DE VALIDACIÓN
Lachenmeir <sup>182</sup>	COD			$r^2=0,999$ (0,5-7,5 ng/mg) LOD=0,02 ng/mg LOQ=0,04 ng/mg CV intradía (0,5; 5; 25 ng/mg) <2,25% CV interdía (0,5; 5; 25 ng/mg) <2,25% MRE (0,5; 5; 25 ng/mg) <6,16%
	MOR		Gas portador: He (1 mL/min) Programa temperaturas horno Tiempo análisis: 21,28 min Columna HP-5MS	$r^2=0,992$ (0,5-25 ng/mg) LOD=0,03 ng/mg LOQ=0,11 ng/mg CV intradía (0,5; 5; 25 ng/mg) <6,48% CV interdía (0,5; 5; 25 ng/mg) <8,31% MRE (0,5; 5; 25 ng/mg) <4,21%
	6-MAM	Extracción con metanol SPE	(30 m x 0,25 mm x 0,25 $\mu$ m) Temperatura inyector: 280°C (splitless) Temperatura interfase: 290°C Fuente ionización: EI (230°C) Temperatura cuádrupolo: 150°C	$r^2=0,993$ (0,5-10 ng/mg) LOD=0,02 ng/mg LOQ=0,15 ng/mg CV intradía (0,5; 5; 25 ng/mg) <4,37% CV interdía (0,5; 5; 25 ng/mg) <5,53% MRE (0,5; 5; 25 ng/mg) <10,43%
	COC			$r^2=0,998$ (0,5-5 ng/mg) LOD=0,01 ng/mg LOQ=0,11 ng/mg CV intradía (0,5; 5; 25 ng/mg) <3,69% CV interdía (0,5; 5; 25 ng/mg) <3,69% MRE (0,5; 5; 25 ng/mg) <11,94%
	BE			$r^2=0,997$ (0,5-7,5 ng/mg) LOD=0,03 ng/mg LOQ=0,26 ng/mg CV intradía (0,5; 5; 25 ng/mg) <3,59% CV interdía (0,5; 5; 25 ng/mg) <6,94% MRE (0,5; 5; 25 ng/mg) <3,11%

REF	COMP	DIGESTIÓN Y/O EXTRACCIÓN	CONDICIONES GC-MS	RESULTADOS DE VALIDACIÓN
<b>Cordero<sup>183</sup></b>	COC			$r^2=0,9992$ (0,1-8 ng/mg) LOQ=0,2 ng/mg CV (0,4; 4 ng/mg) <5,5% R (2 ng/mg)=106%
	BE			$r^2=0,9958$ (0,1-8 ng/mg) LOQ=0,2 ng/mg CV (0,4; 4 ng/mg) <9,9% R (2 ng/mg)=158%
	MOR	Extracción ácida SPE	Gas portador: He (1 mL/min) Programa temperaturas horno Columna ZB-5 (30 m x 0,25 mm; 0,25 $\mu$ m) Temperatura inyector: 280°C (splitless) Rango masas: 55-550 uma	$r^2=0,9902$ (0,1-8 ng/mg) LOQ=0,2 ng/mg CV (0,4; 4 ng/mg) <14,3% R (2 ng/mg)=87%
	6-MAM			$r^2=0,9985$ (0,1-8 ng/mg) LOQ=0,2 ng/mg CV (0,4; 4 ng/mg) <11,4% R (2 ng/mg)=80%
	COD			$r^2=0,9941$ (0,1-8 ng/mg) LOQ=0,2 ng/mg CV (0,4; 4 ng/mg) <11,5% R (2 ng/mg)=91%

REF	COMP	DIGESTIÓN Y/O EXTRACCIÓN	CONDICIONES GC-MS	RESULTADOS DE VALIDACIÓN
<b>Barroso<sup>184</sup></b>	COC	Hidrólisis ácida SPE	Gas portador: He (0,8 mL/min) Programa temperaturas horno Columna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) Temperatura inyector: 220°C (split) Fuente ionización: EI (70 eV, 300 µA) Temperatura detector: 280°C	$r^2=0,9978$ (0,05-20 ng/mg) LOD=0,02 ng/mg LOQ=0,05 ng/mg CV intradía (0,05; 0,5; 7,5; 17,5 ng/mg)<13,3% CV interdía (0,44; 3,72; 5,54 ng/mg)<11,7% MRE intradía (0,05; 0,5; 7,5; 17,5 ng/mg)<14,52% MRE interdía (0,44; 3,72; 5,54 ng/mg)<3,38% R (0,05; 0,5; 7,5; 17,5 ng/mg)>92,5%
	BE			$r^2=0,9987$ (0,05-20 ng/mg) LOD=0,015 ng/mg LOQ=0,05 ng/mg CV intradía (0,05; 0,5; 7,5; 17,5 ng/mg)<6,29% CV interdía (0,79; 1,47; 3,33 ng/mg)<10,5% MRE intradía (0,05; 0,5; 7,5; 17,5 ng/mg)<9,02% MRE interdía (0,79; 1,47; 3,33 ng/mg)<1,15% R (0,05; 0,5; 7,5; 17,5 ng/mg)>90,9%

REF	COMP	DIGESTIÓN Y/O EXTRACCIÓN	CONDICIONES GC-MS	RESULTADOS DE VALIDACIÓN
WU <sup>185</sup>	MOR			$r^2=0,999$ (0,1-10 ng/mg) LOD= 0,05 ng/mg LOQ= 0,08 ng/mg CV intradía (0,1; 5; 10 ng/mg) <7,0% CV interdía (0,1; 5; 10 ng/mg) <6,7% MRE intradía (0,1; 5; 10 ng/mg) <10,6% MRE interdía (0,1; 5; 10 ng/mg) <13,8% R=92,9%
	COD	Extracción ácida SPE	Gas portador: He (1 mL/min) Programa temperaturas horno Columna HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) Temperatura inyector: 230°C (splitless) Temperatura línea transferencia: 280°C Fuente ionización: EI (70eV, 230°C) Temperatura cuádrupolo: 150°C	$r^2=0,999$ (0,1-10 ng/mg) LOD= 0,05 ng/mg LOQ= 0,08 ng/mg CV intradía (0,1; 5; 10 ng/mg) <4,8% CV interdía (0,1; 5; 10 ng/mg) <4,6% MRE intradía (0,1; 5; 10 ng/mg) <10,7% MRE interdía (0,1; 5; 10 ng/mg) <9,3% R=88,6%
	6-MAM			$r^2=0,999$ (0,1-10 ng/mg) LOD= 0,08 ng/mg LOQ= 0,1 ng/mg CV intradía (0,1; 5; 10 ng/mg) <5,5% CV interdía (0,1; 5; 10 ng/mg) <5,9% MRE intradía (0,1; 5; 10 ng/mg) <10,6% MRE interdía (0,1; 5; 10 ng/mg) <12,2% R=89,6%

REF	COMP	DIGESTIÓN Y/O EXTRACCIÓN	CONDICIONES GC-MS	RESULTADOS DE VALIDACIÓN
WU <sup>186</sup>	MOR		<p>Gas portador: He (1 mL/min)</p> <p>Programa temperaturas horno</p> <p>Columna HP-5MS</p> <p>(40 m x 0,25 mm x 0,25 µm)</p> <p>Temperatura inyector: 230°C</p> <p>Temperatura línea transferencia: 280°C</p> <p>Fuente ionización: NCI (150°C)</p> <p>Gas reactivo: Metano</p> <p>Temperatura cuadrupolo: 150°C</p> <p>Dwell time: 20 ms</p>	<p><math>r^2=0,996</math> (0,05-5 ng/mg)</p> <p>LOD= 0,002 ng/mg LOQ= 0,005 ng/mg</p> <p>CV intradía (0,05; 0,5; 2,0 ng/mg) &lt;5,3%</p> <p>CV interdía (0,05; 0,5; 2,0 ng/mg) &lt;7,1%</p> <p>MRE intradía (0,05; 0,5; 2,0 ng/mg) &lt;8,5%</p> <p>MRE interdía (0,05; 0,5; 2,0 ng/mg) &lt;10,2%</p> <p>R (0,05; 0,5; 2,0 ng/mg) &gt;80,5%</p>
	COD	Extracción ácida SPE		<p><math>r^2=0,999</math> (0,05-5 ng/mg)</p> <p>LOD= 0,002 ng/mg LOQ= 0,005 ng/mg</p> <p>CV intradía (0,05; 0,5; 2,0 ng/mg) &lt;5,3%</p> <p>CV interdía (0,05; 0,5; 2,0 ng/mg) &lt;7,2%</p> <p>MRE intradía (0,05; 0,5; 2,0 ng/mg) &lt;8,2%</p> <p>MRE interdía (0,05; 0,5; 2,0 ng/mg) &lt;10,2%</p> <p>R (0,05; 0,5; 2,0 ng/mg) &gt;86,5%</p>
	6-MAM			<p><math>r^2=0,995</math> (0,05-5 ng/mg)</p> <p>LOD= 0,01 ng/mg LOQ= 0,04 ng/mg</p> <p>CV intradía (0,05; 0,5; 2,0 ng/mg) &lt;9,1%</p> <p>CV interdía (0,05; 0,5; 2,0 ng/mg) &lt;12,3%</p> <p>MRE intradía (0,05; 0,5; 2,0 ng/mg) &lt;10,3%</p> <p>MRE interdía (0,05; 0,5; 2,0 ng/mg) &lt;13,2%</p> <p>R (0,05; 0,5; 2,0 ng/mg) &gt;85,8%</p>

REF	COMP	DIGESTIÓN Y/O EXTRACCIÓN	CONDICIONES GC-MS	RESULTADOS DE VALIDACIÓN
Moller <sup>185</sup>	COD		Programa temperaturas horno Columna FactorFour (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) Temperatura inyector: 260°C Temperatura interfase: 310°C Temperatura fuente: 230°C	$r^2=0,9975$ (0,005-5,0 ng/mg) LOD=0,002 ng/mg LOQ=0,004 ng/mg CV intradía (0,5; 5 ng/mg) <3,44% CV interdía (0,5; 5 ng/mg) <11,46%
	MOR	Extracción con metanol HS-SPME		$r^2=0,996$ (0,1-5,0 ng/mg) LOD=0,005 ng/mg LOQ=0,01 ng/mg CV intradía (0,5; 5 ng/mg) <5,11% CV interdía (0,5; 5 ng/mg) <14,34%
	6-MAM			$r^2=0,996$ (0,1-5,0 ng/mg) LOD=0,005 ng/mg LOQ=0,01 ng/mg CV intradía (0,5; 5 ng/mg) <5,14% CV interdía (0,5; 5 ng/mg) <14,77%

REF	COMP	DIGESTIÓN Y/O EXTRACCIÓN	CONDICIONES GC-MS	RESULTADOS DE VALIDACIÓN
Barroso <sup>188</sup>	COD			$r^2=0,9980$ (0,05-50 ng/mg) LLOQ=0,05 ng/mg CV intradía (0,05-40 ng/mg) <18,24% CV interdía (0,75; 12,5; 35 ng/mg) <12,9% MRE intradía (0,05-40 ng/mg) <8,36% MRE interdía (0,75; 12,5; 35 ng/mg) <6,7% R (0,1; 10; 40 ng/mg) >96,84%
	MOR	Extracción con metanol SPE	Gas portador: He (0,8 mL/min) Programa temperaturas horno Columna HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) Temperatura inyector: 220°C (splitless) Fuente ionización: EI (70eV, 300 µA) Temperatura detector: 280°C	$r^2=0,9943$ (0,05-50 ng/mg) LLOQ=0,05 ng/mg CV intradía (0,05-40 ng/mg) <15,77% CV interdía (0,75; 12,5; 35 ng/mg) <11,8% MRE intradía (0,05-40 ng/mg) <10,96% MRE interdía (0,75; 12,5; 35 ng/mg) <2,7% R (0,1; 10; 40 ng/mg) >95,20%
	6-MAM			$r^2=0,9966$ (0,05-50 ng/mg) LLOQ=0,05 ng/mg CV intradía (0,05-40 ng/mg) <11,52% CV interdía (0,75; 12,5; 35 ng/mg) <11,4% MRE intradía (0,05-40 ng/mg) <5,95% MRE interdía (0,75; 12,5; 35 ng/mg) <2,7% R (0,1; 10; 40 ng/mg) >94,15%



Tabla 4.3. Revisión bibliográfica de los métodos de determinación de COC, BE, COD, MOR y 6-MAM mediante GC-MS en muestras de meconio.

REF	COMP	PREPARACIÓN Y/O EXTRACCIÓN	CONDICIONES GC-MS	RESULTADOS DE VALIDACIÓN
Clark <sup>30</sup>	COC	Extracción con metanol SPE	Columna HP-5	LOD=300 ng/g ULOQ=10000 ng/g R=100%
	BE			LOD=300 ng/g ULOQ=3500 ng/g R=30%
Clark <sup>43</sup>	COC	Extracción con metanol SPE	Columna HP-5 Temperatura horno: 260°C	$r^2=0,99$ LOD=250 ng/g ULOQ=10000 ng/g CV intradía (5000 ng/g): 8,1%
	BE			R=99% $r^2=0,97$ LOD=500 ng/g ULOQ=10000 ng/g CV intradía (5000 ng/g): 11,2% R=30%
Varley <sup>55</sup>	BE	Extracción con acetonitrilo SPE	-	ULOQ=5000 ng/g CV (60 ng/g) : 9,6%
Abusada <sup>56</sup>	BE	Extracción con metanol SPE	Gas portador: He (40 cm/min) Programa temperaturas horno Columna HP-Ultra 2 (12 x 0,2 mm x 0,33 µm) Temperatura inyector: 260°C (split) Temperatura línea transferencia: 280°C Voltaje electromultiplicador: 200V	$r=0,946$ (0-1000 ng/g) LOD=6,52 ng/g LOQ= 13,66 ng/g R (100; 250; 500 ng/g)>67,6%
	COC			$r=0,850$ (0-1000 ng/g) LOD=5,94 ng/g LOQ= 9,38 ng/g R (100; 250; 500 ng/g)>77,7%

REF	COMP	PREPARACIÓN Y/O EXTRACCIÓN	CONDICIONES GC-MS	RESULTADOS DE VALIDACIÓN
<b>Lombardero<sup>63</sup></b>	COC	Extracción con metanol SPE	-	25-10000 ng/g LOD= 5 ng/g R=64%
	BE			25-10000 ng/g LOD= 5 ng/g CV interdiá=8% R=21%
<b>Lewis<sup>98</sup></b>	COC	Extracción con ácido acético/acetona SPE	-	LLOQ= 5 ng/g LOD= 2 ng/g CV intradiá=0,67% CV interdiá=12,1%
	BE			LLOQ= 5 ng/g LOD= 2 ng/g CV intradiá=2,99% CV interdiá=19,4%
<b>Oyler<sup>109</sup></b>	COC BE	Extracción con metanol SPE	Columna HP-1 (12 m x 0,2 mm x 0,33 µm) Programa de temperaturas horno Temperatura inyector: 250°C Temperatura línea transferencia: 295°C Voltaje electromultiplicador: 200 mV Rango masas: 50-550 uma	CV intradiá (500 ng/g)<5% LOD<7,5 ng/g

REF	COMP	PREPARACIÓN Y/O EXTRACCIÓN	CONDICIONES GC-MS	RESULTADOS DE VALIDACIÓN
Elsohly <sup>124</sup>	BE	Extracción con tampón fosfato potásico + cloroformo/ isopropanol LLE	Columna DB-1 (10 m x 0,28 mm x 0,4 µm) Programa temperaturas horno Tiempo de análisis: 7 min	$r^2=0,999$ (50-500 ng/g) LOD= 50 ng/g LOQ= 50 ng/g CV intradía (100 ng/g)=1% CV interdía (350 ng/g)=1,7% R (100 ng/g)=33%
	MOR			$r^2=0,9998$ (50-500 ng/g) LOD= 50 ng/g LOQ= 50 ng/g CV intradía (100 ng/g)=7% CV interdía (200 ng/g)=1,1% R (300 ng/g)=56%
	COD	Extracción con tampón fosfato potásico + etil acetato LLE	Columna DB-1 (10 m x 0,28 mm x 0,4 µm) Programa temperaturas horno Tiempo de análisis: 10 min	$r^2=0,9964$ (50-500 ng/g) LOD= 50 ng/g LOQ= 50 ng/g CV intradía (100 ng/g)=8% CV interdía (200 ng/g)=4,1% R (300 ng/g)=64%
	6-MAM			$r^2=0,9964$ (50-500 ng/g) LOD= 50 ng/g LOQ= 50 ng/g CV intradía (100 ng/g)=5% CV interdía (200 ng/g)=5,1% R (50 ng/g)=57%
Elsohly <sup>125</sup>	COC	Extracción con metanol SPE	Gas portador: He (37,8 cm/s; 1,7 atm) Programa de temperaturas horno Columna DB-5 MS (25 m x 0,28 mm x 33 µm) Temperatura inyector: 250°C (splitless) Temperatura interfase: 280°C Voltaje electromultiplicador: 200-400V	LOQ=25 ng/g R=65%
	BE			LOQ=25 ng/g R=50%

### **4.2.3 PREPARACIÓN Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS**

Antes de aplicar las técnicas cromatográficas anteriormente mencionadas se requiere un proceso de preparación y extracción de la muestra que va a ser analizada, esto es, una purificación de la misma para eliminar las posibles interferencias y para concentrar los analitos.

Muestras como la orina no necesitan una preparación antes de la extracción, pero muestras más complejas como el pelo o el meconio sí la necesitan. En las tablas anteriores (4.2 y 4.3) se muestran los métodos de preparación y extracción más usualmente empleados en la detección de los compuestos de interés en muestras de pelo y meconio, respectivamente.

Para el pelo, la mayoría de los laboratorios realizan una etapa previa de lavado, sin embargo, no hay consenso o uniformidad en los procedimientos. Los agentes más utilizados en el lavado son los detergentes como el champú, las soluciones de lavado quirúrgico, los surfactantes como dodecilsulfato de sodio 0,1%, el tampón fosfato, o los disolventes orgánicos como acetona, dietil éter, metanol, etanol, diclorometano, hexano o pentano de varios volúmenes para tiempos de contacto diferentes. En general se utiliza una sola etapa de lavado, aunque a veces se realiza un segundo lavado idéntico. Algunos autores sostienen que analizando la solución de lavado se demuestra que lavados sucesivos eliminan la contaminación externa<sup>17</sup>, sin embargo otros<sup>190</sup> sostienen que no es posible eliminar totalmente dicha contaminación.

Un método útil para distinguir entre ingestión activa de una droga y exposición pasiva es analizar los metabolitos en vez del compuesto original. La COC es una de las pocas drogas que es excretada primariamente a la vez que sus metabolitos. Muchas de las demás drogas de abuso son excretadas en forma de metabolitos, no encontrándose el compuesto original como producto de la excreción de la droga, por lo que habría que tomar en consideración la posibilidad de la exposición pasiva. Presumiblemente, si se encontrasen en el pelo los metabolitos de la COC, habría que asumir que el individuo había ingerido la droga. Pero esto es verdad sólo en parte ya que los tres metabolitos primarios de la COC (BE, EME y ECG) están presentes en sangre y son excretados en

orina en cantidades variables que difieren según los individuos; sin embargo, estos metabolitos pueden también ser formados por hidrólisis básica *in vitro*<sup>189</sup>.

Después de la descontaminación, la muestra de pelo puede ser pulverizada en un molino de bolas o cortada en segmentos antes del paso de hidrólisis, o disuelta en un medio alcalino (NaOH) para mejorar la solubilización de las drogas. Existen muchos procedimientos de hidrólisis utilizando diferentes sustancias (ácidos, bases, enzimas, etc.), sin embargo, es necesario elegir en cada caso el procedimiento adecuado.

Una vez hidrolizado el pelo, las drogas son extraídas del líquido de hidrólisis utilizando diversas técnicas. La más empleada es la extracción en fase sólida (SPE, Solid Phase Extraction), aunque otras técnicas como la extracción líquido-líquido (LLE, Liquid-Liquid Extraction), la extracción con fluidos supercríticos (SFE, Subcritical Fluid Extraction) y la microextracción en fase sólida (SPME, Solid Phase MicroExtraction) también son utilizadas.

En cuanto al meconio, en general éste es homogeneizado en un solvente orgánico, como el metanol o el acetonitrilo, en una mezcla de solventes, como acético/acetona y cloroformo/isopropanol o en un tampón, para ayudar a distribuir la droga en toda la matriz y pueda ser analizado mediante una técnica de *screening* estándar. Sin embargo, es difícil alcanzar los niveles de detección necesarios para un análisis válido sin alguna forma de extracción de las drogas de la matriz debido a la interferencia de la pigmentación y la turbidez del extracto, sobre todo cuando se utiliza detección enzimática o fluorescente. Por este motivo, algunos autores optan por utilizar la LLE o la SPE (más habitual) a continuación de la homogenización del meconio.

La elección de un procedimiento de extracción adecuado es clave en el desarrollo de cualquier método analítico. En esta Tesis, tras probar distintos procedimientos, se ha elegido la SPE como procedimiento de extracción de las muestras de pelo y meconio (previamente preparadas). La SPE ha demostrado ser una herramienta eficaz en la eliminación de las interferencias de la matriz, permitiendo métodos de análisis sensibles, selectivos y robustos. Además permite el enriquecimiento de los analitos seleccionados sin concentrar las interferencias, lo cual es muy importante en el caso de las matrices de estudio, donde los compuestos de interés están presentes en niveles bajos.

La SPE se basa en la retención selectiva de los analitos y en su posterior elución. Para esto se hace pasar la muestra a través de un soporte sólido donde quedará retenida la droga. Dicho soporte tiene un relleno que retiene en una primera etapa la sustancia a determinar y en una segunda se eluye con disolventes orgánicos. Tras cargar la muestra en las columnas de extracción, se procede normalmente a realizar una serie de lavados. Éstos consisten en hacer pasar a través de la columna de extracción distintos disolventes o mezclas de los mismos, de tal modo que eluyan posibles interferencias y otros componentes de las matrices biológicas, pero permitiendo que los analitos de interés permanezcan retenidos hasta su elución.

Los rellenos son generalmente de tipo fase reversa  $C_8$  o  $C_{18}$ , aunque también existen rellenos selectivos para la extracción de drogas básicas, denominados de intercambio catiónico, y para la extracción de drogas ácidas, denominados de intercambio aniónico. Los rellenos apolares ( $C_8$  y  $C_{18}$ ) retienen a los analitos cuando se encuentran en su forma no ionizada, debido a interacciones de tipo apolar-apolar. Los rellenos de intercambio catiónico retienen cationes, y los de intercambio aniónico, aniones.

La SPE puede realizarse en sistemas manuales o automáticos (ASPE, *Automated Solid Phase Extraction*) (Figura 4.4). Existen además sistemas de SPE automáticos en línea con el sistema cromatográfico (normalmente LC). De esta manera el proceso está completamente automatizado y no es necesario realizar pasos intermedios como la evaporación a seco de los extractos, disminuyendo el tiempo de análisis y mejorando el rendimiento del método analítico.



**Figura 4.4.** Sistema de SPE manual (izquierda) y automático (derecha).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Day NL Wagener DK, Taylor PM. Measurement of substance use during pregnancy: methodologic issues. *NIDA Res Monogr* 59 (1985) 36-47.
2. Jones E, Sigall H. The bogus pipeline: a new paradigm for measuring affect and attitude. *Psychol Bull* 76 (1971) 349-364.
3. Garcia DC, Romero A, Garcia GC, Ostrea EM Jr. Gastric fluid analysis for determining gestational cocaine exposure. *Pediatrics* 98(2 Pt 1) (1996) 291-293.
4. O'Connor TA, Ringer KM, Kilbride HW. Cocaine detection in neonatal gastric aspirate samples. *J Perinatol* 16(3 Pt 1) (1996) 197-198.
5. Kim E, Brion LP, Meenan G, Lehrer M, Suresh BR. Perinatal Toxicology Screening: Comparison of various maternal and neonatal samples. *J Perinatol* 18(2) (1998) 116-121.
6. Winecker RE, Goldberger BA, Tebbett I, Behnke M, Eyler FD, Conlon M, Wobie K, Karlis J, Bertholf RL. Detection of cocaine and its metabolites in amniotic fluid and umbilical cord tissue. *J Anal Toxicol* 21(2) (1997) 97-104.
7. Montgomery DP, Plate CA, Jones M, Jones J, Rios R, Lambert DK, Schumtz N, Wiedmeier SE, Burnett J, Ail S, Brandel D, Maichuck G, Durham CA, Herny E, Christensen RD. Using umbilical cord tissue to detect fetal exposure to illicit drugs: a multicentered study in Utah and New Jersey. *J Perinatol* 288(11) (2008) 750-753.
8. de Castro A, Concheiro M, Shakleya DM, Huestis MA. Development and validation of a liquid chromatography mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of methadone, cocaine, opiates and metabolites in human umbilical cord. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877(27) (2009) 3065-71.
9. Mari F, Politi L, Bertol E. Nails of newborn in monitoring drug exposure during pregnancy. *Forensic Sci Int* 179(2-3) (2008) 176-180.
10. Dickson PH, Lind A, Studts P, Nipper HC, Makoid M, Therikildsen D. The routine analysis of breast milk for drugs of abuse in a clinical toxicology laboratory. *J Forensic Sci* 39(1) (1994) 207-214.

11. Dams R, Choo RE, Lambert WE, Jones H, Huestis MA. Oral fluid as an alternative matrix to monitor opiate and cocaine use in substance-abuse treatment patients. *Drug and Alcohol Dependence* 87(2-3) (2007) 258-267.
12. Dams R, Murphy CM, Choo RE, Lambert WE, De Leenheer AP; Huestis MA. LC-atmospheric pressure chemical ionization-MS/MS analysis of multiple illicit drugs, methadone, and their metabolites in oral fluid following protein precipitation. *Anal Chem* 75(4) (2005) 798-804.
13. Brunet BR, Barnes AJ, Choo RE, Mura P, Jones HE, Huestis MA. Monitoring pregnant women's illicit opiate and cocaine use with sweat testing. *Ther Drug Monit* 32(1) (2010) 40-49.
14. Joya X, Pujadas M, Falcón M, Civit E, Garcia-Algar O, Vall O, Pichini S, Luna A, de la Torre R. Gas chromatography-mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of drugs of abuse in human placenta at 12th week of gestation. *Forensic Sci Int* 196(1-3) (2010) 38-42.
15. de Castro A, Concheiro M, Shakleya DM, Huestis MA. Simultaneous quantification of methadone, cocaine, opiates, and metabolites in human placenta by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 33(5) (2009) 243-52.
16. Moore C, Browne S, Tebbett I, Negrusz A, Meyer W, Jain L. Determination of cocaine and benzoylecgonine in human amniotic fluid using high flow solid-phase extraction columns and HPLC. *Forensic Sci Int* 56(2) (1992) 177-181.
17. Jenkins AJ. Drug testing in alternative biological specimens. Nueva York, Humana Press, 2008.
18. Henderson GL, Harkey MR, Jones RT, Zhou C. Effect of external contamination on the analysis of hair for cocaine. Comunicación presentada en el Joint Meeting of Forensic Toxicologists and the Canadian Society of Forensic Scientists, Montreal, Quebec, Canada, Septiembre 23-27, 1991.
19. Ostrea EM Jr, Lynn SM, Wayne RN, Stryker JC. Tissue distribution of morphine in the newborns of addicted monkeys and humans. Clinical implications. *Dev Pharmacol Ther* 1(2-3) (1980) 163-170.
20. Oro AS, Dixon SD. Perinatal cocaine and methamphetamine exposure: Maternal and neonatal correlates. *J Pediatr* 111(4) (1987) 571-578.
21. Ostrea EM Jr, Asensio D, Naluz A, Simkowski K, Subramanian MG, Abel E. The detection of heroin, cocaine and cannabinoid metabolites in the stools of infants of drug dependent mothers. *Pediatr Res* 21(4 Pt 2) (1987) 240A.



22. Parton L , Warburton D, Hill V, Baumgartner W. Quantification of fetal cocaine exposure by radioimmunoassay of hair. *Pediatr Res* 21(4 Pt 2) (1987) 372A.
23. Frank DA, Zuckerman BS, Amaro H, Aboagye K, Bauchner H, Cabral H, Fried L, Hingson R, Kayne H, Levenson SM, Parker S, Reece H, Vinci R. Cocaine use during pregnancy: prevalence and correlates. *Pediatrics* 82(6) (1988) 888-895.
24. Halstead AC, Godolphin W, Lockitch G, Segal S. Timing of specimen collection is crucial in urine screening of drug dependent mothers and newborns. *Clin Biochem* 21(1) (1988) 59-61.
25. Ostrea EM Jr, Parks PM Jr, Brady MJ. Rapid isolation and detection of drugs in meconium of infants of drug-dependent mothers. *Clin Chem* 34(11) (1988) 2372-2373.
26. Graham K, Koren G, Klein J, Schneiderman J, Greenwald M. Determination of gestational cocaine exposure by hair analysis. *JAMA* 262(23) (1989) 3328-3330.
27. Osterloh JD, Lee BL. Urine drug screening in mothers and newborns. *Am J Dis Child* 143(7) (1989) 791-793.
28. Ostrea EM Jr, Brady MJ, Parks PM, Asensio DC, Naluz A. Drug screening of meconium in infants of drug-dependent mothers: An alternative to urine testing. *J Pediatr* 115(3) (1989) 474-477.
29. Chasnoff IJ, Landress HJ, Barrett ME. The prevalence of illicit-drug or alcohol use during pregnancy and discrepancies in mandatory reporting in Pinellas County, Florida. *N Engl J Med* 322(17) (1990) 1202-1206.
30. Clark GD, Rosenzweig B, Raisys VA. Analysis of cocaine and benzoylecgonine in meconium of infants born to cocaine dependent mothers. *Clin Chem* 36 (1990) 1022.
31. Gillogley KM, Evans AT, Hansen RL, Samuels SJ, Batra KK. The perinatal impact of cocaine, amphetamine, and opiate use detected by universal intrapartum screening. *Am J Obstet Gynecol* 163 (5 Pt 1) (1990) 1535-1542.
32. Mastrogiannis DS, Decavalas GO, Verma U, Tejani N. Perinatal outcome after recent cocaine usage. *Obstet Gynecol* 76(1) (1990) 8-11.
33. Matera C, Warren WB, Moomjy M, Fink DJ, Fox HE. Prevalence of use of cocaine and other substances in an obstetric population. *Am J Obstet Gynecol* 163(3) (1990) 797-801.

34. Ostrea EM Jr, Martier S, Welch R, Brady M. Sensitivity of meconium drug screening in detecting intrauterine drug exposure of infants. *Pediatr Res* 27 (4 Pt 2) (1990) 219A.
35. Welch RA, Martier SS, Ager JW, Ostrea EM, Sokol RJ. Radioimmunoassay of hair: a valid technique for determining maternal cocaine abuse. *Substance Abuse* 11(4) (1990) 214-217.
36. Maynard EC, Amoruso LP, Oh W. Meconium for drug testing. *Am J Dis Child* 145(6) (1991) 650-652.
37. Ostrea EM Jr. Method for detecting maternally transferred drug metabolites in newborns infants. Patent number: 5,015,589. May 14, 1991.
38. Polzin WJ, Kopelman JN, Brady K, Read JA. Screening for illicit drug use in a military obstetric population. *Obstet Gynecol* 78(4) (1991) 600-601.
39. Schutzman DL, Frankenfield-Chernicoff M, Clatterbaugh HE, Singer J. Incidence of intrauterine cocaine exposure in a suburban setting. *Pediatrics* 88(4) (1991) 825-827.
40. Bandstra ES, Steele BW, Chitwood DD, Wu NC, Coyne T, Freier MC, Bean JA, Oei J, Burkett G, Hime GW, Hearn WL. Detection of in utero cocaine exposure: a comparative methodologic study. *Pediatr Res* 31(4 Pt 2) (1992) 58A.
41. Browne SP, Tebbett IR, Moore CM, Dusick A, Covert R, Yee GT. Analysis of meconium for cocaine in neonates. *J Chromatogr* 575(1) (1992) 158-161.
42. Callahan CM, Grant TM, Phipps P, Clark G, Novack AH, Streissguth AP, Raisys VA. Measurement of gestational cocaine exposure: Sensitivity of infants` hair, meconium, and urine. *J Pediatr* 120(5) (1992) 763-768.
43. Clark GD, Rosenzweig IB, Raisys V, Callahan CM, Grant TM, Streissguth AP. The analysis of cocaine and benzoylecgonine in meconium. *J Anal Toxicol* 16(4) (1992) 261-263.
44. Dahlem P, Bucher HU, Ursprung T, Mieth D, Gautschi K. Drug detection in meconium. *Monatsschrift fur Kinderheilkunde* 140(6) (1992) 354-356.
45. Forman R, Schneiderman J, Klein J, Graham K, Greenwald M, Koren G. Accumulation of cocaine in maternal and fetal hair; the dose response curve. *Life Sci* 50(18) (1992) 1333-1341.

46. Howe TL, Tsushima JH, Batra KK. Neonatal screening of meconium for drugs of abuse by Abbott TDx with GC and GC/MS confirmation: Comparison with urine EMIT results. *Clin Chem* 38 (1992) 1005.
47. Kintz P, Tracqui A, Mangin P. Tobacco, drug and narcotic abuse during pregnancy. Evaluation of in utero exposure by hair analysis. *Presse Méd* 21(44) (1992) 2139-2141.
48. Mirochnick M, Rehm K, Brown E, Frank DA, Perez R, Turner A. Revised and expanded method for meconium drug analysis. *Pediatr Res* 31(4 Pt 2) (1992) 63A.
49. Ostrea EM Jr, Brady M, Gause S, Raymundo AL, Stevens M. Drug screening of newborns by meconium analysis: a large-scale, prospective, epidemiologic study. *Pediatrics* 89(1) (1992) 107-113.
50. Ostrea EM Jr, Lizardo E, Tanafranca M. The prevalence of illicit drug exposure in infants in the NICU as determined by meconium drug screen: Its medical and economic impact. *Pediatr Res* 31(4 Pt 2) (1992) 215A.
51. Ostrea EM Jr, Romero A. Selection criteria for routine drug screening of infants by meconium analysis. *Pediatr Res* 31(4 Pt 2) (1992) 215A.
52. Romero A, Mac E, Knapp DK, Ostrea EM Jr. Evaluation of a rapid meconium drug testing system for clinical use. *Pediatr Res* 31(4 Pt 2) (1992) 63A.
53. Sloan LB, Gay JW, Snyder SW, Bales WR. Substance abuse during pregnancy in a rural population. *Obstet Gynecol* 79(2) (1992) 245-248.
54. Steele BW, Bandstra ES, Wu NC, Hearn L, Coyne T, Freier MC, Chitwood D, Burkett G. The use of meconium to detect cocaine exposure as compared with maternal and neonatal urine analyzed by five methods. *Clin Chem* 38(6) (1992) 1011.
55. Varley J, Ryan R, Wong TC. Detection of benzoylecgonine in meconium. A more sensitive index of intrauterine cocaine exposure. *Clin Chem* 38 (1992) 1003.
56. Abusada GM, Abukhalaf IK, Alford DD, Vinzon-Bautista I, Pramanik AK, Ansari NA, Manno JE, Manno BR. Solid-phase extraction and GC/MS quantitation of cocaine, ecgonine methyl ester, benzoylecgonine, and cocaethylene from meconium, whole blood, and plasma. *J Anal Toxicol* 17(6) (1993) 353-358.

57. Burke MS, Roth D. Anonymous cocaine screening in a private obstetric population. *Obstet Gynecol* 81(3) (1993) 354-356.
58. DiGregorio GJ, Barbieri EJ, Ferko AP, Ruch EK. Prevalence of cocaethylene in the hair of pregnant women. *J Anal Toxicol* 17(7) (1993) 445-446.
59. Henderson LO, Powell MK, Hannon WH, Miller BB, Martin ML, Hanzlick RL, Vroon D, Sexson WR. Radioimmunoassay screening of dried blood spot materials for benzoilecgonine. *J Anal Toxicol* 17(1) (1993) 42-47.
60. Horn PT, Mendelsohn J, Bowers MI, Chappen M, Schreier JR, Spalding SH, Weyher J, Berkelhamer JE. Effectiveness of a targeted screening program in identifying infants with positive urine toxicology screening results in a regular neonatal nursery. *J Pediatr* 123(1) (1993) 137-139.
61. Kintz P, Mangin P. Determination of gestational opiate, nicotine, benzodiazepine, cocaine and amphetamine exposure by hair analysis. *J Forensic Sci Soc* 33(3) (1993) 139-142.
62. Kintz P, Mangin P. Evidence of gestational heroin or nicotine exposure by analysis of fetal hair. *Forensic Sci Int* 63(1-3) (1993) 99-104.
63. Lombardero N, Casanova O, Behnke M, Eyler FD, Bertholf RL. Measurement of cocaine and metabolites in urine, meconium, and diapers by gas chromatography/mass spectrometry. *Ann Clin Lab Sci* 23(5) (1993) 385-394.
64. Marques PR, Tippetts AS, Branch DG. Cocaine in the hair of mother-infant pairs: quantitative analysis and correlations with urine measures and self-report. *Am J Drug Alcohol Abuse* 19(2) (1993) 159-175.
65. Montes N, Romero A, Ostrea EM Jr. Improved method of GC/MS analysis of meconium for opiate (M), cocaine (C) and cannabinoid (THC). *Pediatr Res* 33(4 Pt 2) (1993) 66A.
66. Moore CM, Brown S, Negrusz A, Tebbett I, Meyer W, Jain L. Determination of cocaine and its major metabolite, benzoylecgonine, in amniotic fluid, umbilical cord blood, umbilical cord tissue, and neonatal urine: a case study. *J Anal Toxicol* 17(1) (1993) 62.
67. Murphey LJ, Olsen GD, Konkol RJ. Quantitation of benzoynorecgonine and other cocaine metabolites in meconium by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 613(2) (1993) 330-335.

68. Needleman R, Zuckerman B, Anderson GM, Mirochnick M, Cohen DJ. Cerebrospinal fluid monoamine precursors and metabolites in human neonates following in utero cocaine exposure: A preliminary study. *Pediatrics* 92(1) (1993) 55-60.
69. Ostrea EM Jr. Method for detecting maternally transferred drug metabolites in newborn infants. Patent number 5,185,267. Feb 9, 1993.
70. Ostrea EM Jr, Romero A, Yee H. Adaptation of the meconium drug test for mass screening. *J Pediatr* 122(1) (1993) 152-154.
71. Romero A, Mac E, Knapp DK, Ostrea EM Jr. Evaluation of a rapid, meconium drug testing system for clinical use. *Pediatr Res* 33 (1993) 68A.
72. Rosengren SS, Longobucco DB, Bernstein BA, Fishman S, Cooke E, Bactor F, Lewis SC. Meconium testing for cocaine metabolite: prevalence, perceptions, and pitfalls. *Am J Obstet Gynecol* 168(5) (1993) 1449-1456.
73. Steele BW, Bandstra ES, Wu NC, Hime GW, Hearn WL. M-hydroxybenzoylecgonine: An important contributor to the immunoreactivity in assays for benzoylecgonine in meconium. *J Anal Toxicol* 17(6) (1993) 348-352.
74. Vaughn AJ, Carzoli RP, Sanchez-Ramos L, Murphy S, Khan N, Chiu T. Community-wide estimation of illicit drug use in delivering women: prevalence, demographics, and associated risk factors. *Obstet Gynecol* 82(1) (1993) 92-96.
75. Vega WA, Kolody B, Hwang J, Noble A. Prevalence and magnitude of perinatal substance exposures in California. *N Engl J Med* 329(12) (1993) 850-854.
76. Welch E, Fleming LE, Peyser I, Greenfield W, Steele BW, Bandstra ES. Rapid cocaine screening of urine in a newborn nursery. *J Pediatr* 123(3) (1993) 468-470.
77. Browne S, Moore C, Negrusz A, Tebbett I, Covert R, Dusick A. Detection of cocaine, norcocaine, and cocaethylene in the meconium of premature neonates. *J Forensic Sci* 39(6) (1994) 1515-1519.
78. Casanova OQ, Lombardero N, Behnke M, Eyler FD, Conlon M, Bertholf RL. Detection of cocaine exposure in the neonate. Analyses of urine, meconium, and amniotic fluid from mothers and infants exposed to cocaine. *Arch Pathol Lab Med* 118(10) (1994) 988-993.

79. DiGregorio GJ, Ferko AP, Barbieri EJ, Ruch EK, Chawla H, Keohane D, Rosenstock R, Aldano A. Determination of cocaine usage in pregnant women by a urinary EMIT drug screen and GC-MS analyses. *J Anal Toxicol* 18(5) (1994) 247-250.
80. Franssen RM, Stolk LM, van den Brand W, Smit BJ. Analysis of morphine and amphetamine in meconium with immunoassay and HPLC-Diode-Array Detection. *J Anal Toxicol* 18(5) (1994) 294-295.
81. Grant T, Brown Z, Callahan C, Barr H, Streissguth AP. Cocaine exposure during pregnancy: Improving assessment with radioimmunoassay of maternal hair. *Obstet Gynecol* 83(4) (1994) 524-531.
82. Johnson D, Schwartz J, Forman R. Assessment of in utero exposure to cocaine: Radioimmunoassay testing for BZ in meconium, neonatal hair and maternal hair. *Can J Clin Pharmacol* 2 (1994) 83-86.
83. Jortani SA, Saady JJ, Poklis A. Improved detection of cocaine metabolite in urine from pregnant women and neonates by modified immunoassay. *Res Commun Alcohol Subst Abuse* 15(3-4) (1994) 124-130.
84. Klein J, Forman R, Eliopoulos C, Koren G. A method for simultaneous measurement of cocaine and nicotine in neonatal hair. *Ther Drug Monit* 16(1) (1994) 67-70.
85. Lewis DE. Forensically acceptable determinations of gestational fetal exposure to drugs and other chemical agents. Patent number: 5,326,708. Jul 5, 1994.
86. Lewis DE, Moore CM, Leikin JB. Cocaethylene in meconium specimens. *Clin Toxicol* 32(6) (1994) 697-703.
87. Martinez Crespo JM, Antolín E, Comas C, Coll O, Marqués JM, Gual A, Fortuny A. The prevalence of cocaine abuse during pregnancy in Barcelona. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 56(3) (1994) 165-167.
88. Morales V, Knapp DK, Utarnachitt R, Utarnachitt R, Ostrea EM Jr. Meconium analysis will detect intrapartum drug use: Clinical implications. *Pediatr Res* 35(4 Pt 2) (1994) 87A.
89. Moriya F, Chan KM, Noguchi TT, Wu PYK. Testing for drugs of abuse in meconium of newborn infants. *J Anal Toxicol* 18(1) (1994) 41-45.

90. Ostrea EM Jr, Knapp K, Ostrea A, Tannenbaum L, Saleri V. A prospective study comparing systematic interview and analysis of maternal hair and meconium to determine illicit drug use during pregnancy. *Pediatr Res* 35(4 Pt 2) (1994) 245A.
91. Ostrea EM Jr, Romero A, Knapp DK, Ostrea AR, Lucena JE, Utarnachitt RB. Postmortem drug analysis of meconium in early-gestation human fetuses exposed to cocaine: Clinical implications. *J Pediatr* 124(3) (1994) 477-479.
92. Pegues DA, Engलगau MM, Woernle CH. Prevalence of illicit drugs detected in the urine of women of childbearing age in Alabama public health clinics. *Public Health Rep* 109(4) (1994) 530-538.
93. Potter S, Klein J, Valiante G, Stack DM, Papageorgiou A, Stott W, Lewis D, Koren G, Zelazo PR. Maternal cocaine use without evidence of fetal exposure. *J Pediatr* 125(4) (1994) 652-654.
94. Robinson SE, Enters EK, Jackson GF, Chinchilli VM, Maher JR, McDowell KP, Allen HM, Guo H. Maternal and fetal brain and plasma levels of cocaine and benzoylecgonine after acute or chronic maternal intravenous administration of cocaine. *J Pharmacol Exp Ther* 271(3) (1994) 1234-1239.
95. Ryan RM, Wagner CL, Schultz JM, Varley J, DiPrea J, Sherer DM, Phelps DL, Kwong T. Meconium analysis for improved identification of infants exposed to cocaine in utero. *J Pediatr* 125(3) (1994) 435-440.
96. Wingert WE, Feldman MS, Kim MH, Noble L, Hand I, Yoon JJ. A comparison of meconium, maternal urine and neonatal urine for detection of maternal drug use during pregnancy. *J Forensic Sci* 39(1) (1994) 150-158.
97. Farkas AG, Colbert DL, Erskine KJ. Anonymous testing for drug abuse in an antenatal population. *Br J Obstet Gynaecol* 102(7) (1995) 563-565.
98. Lewis DE, Moore CM, Leikin JB, Koller A. Meconium analysis for cocaine: A validation study and comparison with paired urine analysis. *J Anal Toxicol* 19(3) (1995) 148-150.
99. Bibb KW, Stewart DL, Walker JR, Cook VD, Wagener RE. Drug screening in newborns and mothers using meconium samples, paired urine samples, and interviews. *J Perinatol* 15(3) (1995) 199-202.
100. Mac E, Matias O, Ostrea EM Jr, Mazhar M. Clinical adaptation of HPLC to meconium drug testing. *Pediatr Res* 37(4 Pt2) (1995) 221A.

101. Mirochnick R, Frank DA, Cabral H, Turner A, Zuckerman B. Relation between meconium concentration of the cocaine metabolite benzoylecgonine and fetal growth. *J Pediatr* 126(4) (1995) 636-638.
102. Moore CM, Deitermann D, Lewis D, Leikin J. The detection of hydrocodone in meconium: two case studies. *J Anal Toxicol* 19(6) (1995) 514-518.
103. Moore C, Lewis D, Leikin J. False-positive and false-negative rates in meconium drug testing. *Clin Chem* 41(11) (1995) 1614-1616.
104. Moriya F, Chan KM, Noguchi TT, Parnassus WN. Detection of drugs-of-abuse in meconium of a stillborn baby and in stool of a deceased 41-day-old infant. *J Forensic Sci* 40(3) (1995) 505-508.
105. Vorhees CV, Reed TM, Acuff-Smith KD, Schiling MA, Cappon GD, Fisher JE, Pu C. Long-term learning deficits and changes in unlearned behaviors following in utero exposure to multiple daily doses of cocaine during different exposure periods and maternal plasma cocaine concentrations. *Neurotoxicol Teratol* 17(3) (1995) 253-264.
106. Westdorp EJ, Salomone JA 3<sup>rd</sup>, Roberts DK, McIntyre MK, Watson WA. Validation of a rapid urine screening assay for cocaine use among pregnant emergency patients. *Acad Emerg Med* 2(9) (1995) 795-798.
107. Chiarotti M, Strano-Rossi S, Offidani C, Fiori A. Evaluation of cocaine use during pregnancy through toxicological analysis of hair. *J Anal Toxicol* 20(7) (1996) 555-558.
108. Newel R, Mieczkowski T, Montenegro R. Hair analysis for drug abuse among postpartum women with a comparison of neonatal birthweights: Results from an exploratory study in Pinellas County, Florida. *The International Journal of Drug Testing* 1(1) (1996) 68-72.
109. Oyler J, Darwin WD, Preston KL, Suess P, Cone EJ. Cocaine disposition in meconium from newborns of cocaine-abusing mothers and urine of adult drug users. *J Anal Toxicol* 20(6) (1996) 453-462.
110. Sampèriz S, Millet V, Arditti J, Lacroze V, Masset D, Bourdon H, Jouglard J, Unal D. Detection of prenatal drug exposure by urine, meconium and hair testing in infants from drug-dependent mother. *Arch Pédiatr* 3 (1996) 440-444.



111. Sosnoff CS, Ann Q, Bernert JT Jr, Powell MK, Miller BB, Henderson LO, Hannon WH, Fernhoff P, Sampson EJ. Analysis of benzoylecgonine in dried blood spots by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 20(3) (1996) 179-184.
112. Strano-Rossi S, Chiarotti M, Fiori A, Auriti C, Seganti G. Cocaine abuse in pregnancy: its evaluation through hair analysis of pathological new-borns. *Life Sci* 59(22) (1996) 1909-1915.
113. Birnback DJ, Stein DJ, Grunebaum A, Danzer BI, Thys DM. Cocaine screening of parturients without prenatal care: An evaluation of a rapid screening assay. *Anesth Anal* 84(1) (1997) 76-79.
114. Brown HL, Hiett AK, Gtith SI. Illicit drug use by pregnant women in metropolitan, medium sized, and rural counties using meconium sampling. *Acta Diabetol Lat* 176 (1 part II) (1997) S124.
115. Henderson LO, Powell MK, Hannon WH, Bernert JT Jr, Pass KA, Fernhoff P, Ferre CD, Martin L, Franko E, Rochat RW, Brantley MD, Sampson E. An evaluation of the use of dried blood spots from newborn screening for monitoring the prevalence of cocaine use among childbearing women. *Biochem Mol Med* 61(2) (1997) 143-151.
116. Lauria MR, Qureshi F, Jacques SM, Kurtzhals P, Ostrea EM, Gonik B, Sorokin Y. Meconium drug screening of stillborn infants: A feasibility study. *Fetal Diag Ther* 12(4) (1997) 248-251.
117. Mirochnick M, Meyer J, Frank DA, Cabral H, Tronick EZ, Zuckerman B. Elevated plasma norepinephrine after in utero exposure to cocaine and marijuana. *Pediatrics* 99(4) (1997) 555-559.
118. Monga M, Wong SS, Larrabee KD, Andres RL. Correlation of urine and serum benzoylecgonine levels in pregnant women. *Am J Perinatol* 14(10) (1997) 637-639.
119. Silvestre MA, Lucena JE, Roxas R Jr, Evangelista ES, Ostrea EM. Effects of timing, dosage, and duration of morphine intake during pregnancy on the amount of morphine in meconium in a rat model. *Biol Neonate* 72(2) (1997) 112-117.
120. Ursitti F, Klein J, Koren G. Clinical utilization of the neonatal hair test for cocaine: A four-year experience in Toronto. *Biol Neonate* 72(6) (1997) 345-351.
121. Vega WA, Kolody B, Hwang J, Noble A, Porter PA. Perinatal drug use among immigrant and native-born Latinas. *Subst Use Misuse* 32(1) (1997) 43-62.

122. Iwersen S, Schmoldt A, Schulz F, Püschel K. Evidence of gestational heroin exposure by comparative analysis of fetal and maternal body fluids, tissues, and hair in a heroin-related death. *J Anal Toxicol* 22(4) (1998) 296-298.
123. Ostrea EM Jr, Matias O, Keane C, Mac E, Utarnachitt R, Ostrea A, Mazhar M. Spectrum of gestational exposure to illicit drugs and other xenobiotic agents in newborn infants by meconium analysis. *J Pediatr* 133(4) (1998) 513-51.
124. ElSohly MA, Stanford DF, Murphy TP, Lester BM, Wright LL, Smeriglio VL, Verter J, Bauer CR, Shankaran S, Bada HS, Walls HC. Immunoassay and GC-MS procedures for the analysis of drugs of abuse in meconium. *J Anal Toxicol* 23(6) (1999) 436-445.
125. ElSohly MA, Kopycki W, Feng S, Murphy TP. Identification and analysis of the major metabolites of cocaine in meconium. *J Anal Toxicol* 23(6) (1999) 446-451.
126. Fischer G, Jagsch R, Eder H, Gombas W, Etzersdorfer P, Schmidl-Mohl K, Schatten C, Weninger M, Aschauer HN. Comparison of methadone and slow-release morphine maintenance in pregnant addicts. *Addiction* 94(2) (1999) 231-239.
127. Gerola O, Montagna M, Vignali C, Cerri C, Pistorio A, Di Mario M, Spinillo A, Rondini G. Evaluation of gestational exposure to opiates and cocaine by meconium analysis. *Rivista Italiana di Pediatria* 25(6) (1999) 1073-1077.
128. Sherwood RA, Keating J, Kavvadia V, Greenough A, Peters TJ. Substance misuse in early pregnancy and relationship to fetal outcome. *Eur J Pediatr* 158(6) (1999) 488-492.
129. Wang PP, Bartlett MG. Identification and quantitation of cocaine N-oxide: A thermally labile metabolite of cocaine. *J Anal Toxicol* 23(1) (1999) 62-66.
130. Klein J, Karaskov T, Koren G. Clinical applications of hair testing for drugs of abuse-the Canadian experience. *Forensic Sci Int* 107(1-3) (2000) 281-288.
131. Kuhn L, Kline J, Ng S, Levin B, Susser M. Cocaine use during pregnancy and intrauterine growth retardation: new insights based on maternal hair tests. *Am J Epidemiol* 152(2) (2000) 112-119.
132. Koren G, Klein J, McMartin K. Diagnosing intrauterine exposure to cocaine by hair testing: six years of clinical use. *Ther Drug Monit* 20(5) (1998) 478-480.

133. Srinivasan K, Wang PP, Eley AT, White CA, Bartlett MG. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of cocaine and its metabolites from blood, amniotic fluid, placental and fetal tissues: study of the metabolism and distribution of cocaine in pregnant rats. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 745(2) (2000) 287-303.
134. Vorhees CV, Inman-Wood SL, Morford LL, Reed TM, Moran MS, Pu C, Cappon GD. Evaluation of neonatal exposure to cocaine on learning, activity, startle, scent marking, immobility, and plasma cocaine concentration. *Neurotoxicology and Teratology* 22(2) (2000) 255-265.
135. Xia Y, Wang P, Bartlett MG, Solomon HM, Busch KL. An LC-MS-MS method for comprehensive analysis of cocaine and cocaine metabolites in meconium. *Anal Chem* 72(4) (2000) 764-771.
136. Bergin C, Cameron CE, Fleitz RS, Patel AV. Measuring prenatal drug exposure. *J Pediatr Nurs* 16(4) (2001) 245-255.
137. Birnbach DJ, Browne IM, Kim A, Stein DJ, Thys DM. Identification of polysubstance abuse in parturient. *Br J Anaesth* 87(3) (2001) 488-490.
138. Cunha GB, Rotta NT, Silva AR, Dieder AL, Wolf AL, Moser C, Silva FF, Socal MP, Silva PF, Margis R. Prevalence of prenatal exposure to cocaine in a sample of newborns from a university teaching hospital. *J Pediatr (Rio J)* 77(5) (2001) 369-373.
139. Lester BM, ElSohly M, Wright LL, Smeriglio VL, Verter J, Bauer CR, Shankaran S, Bada HS, Walls HH, Huestis MA, Finnegan LP, Maza PL. The maternal lifestyle study: drug use by meconium toxicology and maternal self-report. *Pediatrics* 107(2) (2001) 309-317.
140. Ostrea EM Jr, Knapp DK, Tannenbaum L, Ostrea AR, Romero A, Salari V, Ager J. Estimates of illicit drug use during pregnancy by maternal interview, hair analysis, and meconium analysis. *J Pediatr* 138(3) (2001) 344-348.
141. Katikaneni LD, Salle FR, Hulsey TC. Neonatal hair analysis for benzoylecgonine: A sensitive and semiquantitative biological marker for chronic gestational cocaine exposure. *Biol Neonate* 81(1) (2002) 29-37.
142. Bar-Oz B, Klein J, Karasov T, Koren G. Comparison of meconium and neonatal hair analysis for detection of gestational exposure to drugs of abuse. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 88(2) (2003) F98-F100.

143. Pichini S, Pacifici R, Pellegrini M, Marchei E, Pérez-Alarcón E, Puig C, Vall O, García-Algar O. Development and validation of a liquid chromatography-mass spectrometry assay for the determination of opiates and cocaine in meconium. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 794(2) (2003) 281-292.
144. Vinner E, Vignau J, Thibault D, Codaccioni X, Brassart C, Humbert L, Lhermitte M. Hair analysis of opiates in mothers and newborns for evaluating opiate exposure during pregnancy. *Forensic Sci Int* 133(1-2) (2003) 57-62.
145. Vinner E, Vignau J, Thibault D, Codaccioni X, Brassart C, Humbert L, Lhermitte M. Neonatal hair analysis contribution to establishing a gestational drug exposure profile and predicting a withdrawal syndrome. *Ther Drug Monit* 25(4) (2003) 421-432.
146. Eyler FD, Behnke M, Wobie K, Garvan CW, Tebbett I. Relative ability of biological specimens and interviews to detect prenatal cocaine use. *Neurotoxicol Teratol* 27(4) (2005) 677-687.
147. Pichini S, Marchei E, Pacifici R, Pellegrini M, Lozano J, García-Algar O. Application of a validated high-performance liquid chromatography-mass spectrometry assay to the analysis of m- and p-hydroxybenzoylecgonine in meconium. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 820(1) (2005) 151-156.
148. Pichini S, Puig C, Zuccaro P, Marchei E, Pellegrini M, Murillo J, Vall O, Pacifici R, García-Algar O. Assessment of exposure to opiates and cocaine during pregnancy in a Mediterranean city: preliminary results of the "Meconium Project". *Forensic Sci Int* 153(1) (2005) 59-65.
149. Montgomery D, Plate C, Alder SC, Jones M, Jones J, Christensen RD. Testing for fetal exposure to illicit drugs using umbilical cord tissue vs meconium. *J Perinatol* 26(1) (2006) 11-14.
150. Williamson S, Jackson L, Skeoch C, Azzim G, Anderson R. Determination of the prevalence of drug misuse by meconium analysis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 91(4) (2006) F291-F292.
151. Coles R, Kushnir MM, Nelson GJ, McMillin GA, Urry FM. Simultaneous determination of codeine, morphine, hydrocodone, hydromorphone, oxycodone, and 6-acetylmorphine in urine, serum, plasma, whole blood, and meconium by LC-MS-MS. *J Anal Toxicol* 31(1) (2007) 1-14.
152. Mitsuhiro SS, Chalem E, Barros MC, Guinsburg R, Laranjeira R. Prevalence of cocaine and marijuana use in the last trimester of adolescent pregnancy: socio-demographic, psychosocial and behavioral characteristics. *Addict Behav* 32(2) (2007) 392-397.

153. Azadi A, Dildy GA 3rd. Universal screening for substance abuse at the time of parturition. *Am J Obstet Gynecol* 198(5) (2008) e30-e32.
154. Gray TR, Shakleya DM, Huestis MA. A liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of 20 drugs of abuse and metabolites in human meconium. *Anal Bioanal Chem* 393(8) (2009) 1977-1990.
155. Mitsuhiro SS, Chalem E, Barros MC, Guinsburg R, Laranjeira R. Prevalence of cocaine and marijuana use in the last trimester of adolescent pregnancy: socio-demographic, psychosocial and behavioral characteristics. *Addict Behav* 32(2) (2007) 392-397.
156. Marin SJ, Keith L, Merrell M, McMillin GA. Comparison of drugs of abuse detection in meconium by EMIT® II and ELISA. *J Anal Toxicol* 33(3) (2009) 148-154.
157. Falcon M, Valero F, Pellegrini M, Rotolo MC, Scaravelli G, Joya J, Vall O, Algar OG, Luna A, Pichini S. Exposure to psychoactive substances in women who request voluntary termination of pregnancy assessed by serum and hair testing. *Forensic Sci Int* 196(1-3) (2010) 22-26.
158. Gunn J, Kriger S, Terrell AR. Detection and quantification of cocaine and benzoylecgonine in meconium using solid phase extraction and UPLC/MS/MS. *Methods Mol Biol* 603 (2010) 165-74.
159. Di Maio VJM, Dana SE. *Manual de Patología Forense*. Madrid, Díaz de Santos, 2003.
160. Bourland JA, Hayes EF, Kelly RC, Sweeney SA, Hatab MM. Quantitation of cocaine, benzoylecgonine, cocaethylene, methylecgonine, and norcocaine in human hair by positive ion chemical ionization (PICI) gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 24(7) (2000) 489-495.
161. Gambelunghe C, Rossi R, Ferranti C, Rossi R, Bacci M. Hair analysis by GC/MS/MS to verify abuse of drugs. *J Appl Toxicol* 25(3) (2005) 205-211.
162. Cognard E, Rudaz S, Bouchonnet S, Staub C. Analysis of cocaine and three of its metabolites in hair by gas chromatography-mass spectrometry using ion-trap detection for CI/MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 826(1-2) (2005) 17-25.
163. Harkey MR, Henderson GL, Zhou C. Simultaneous quantitation of cocaine and its major metabolites in human hair by gas chromatography/chemical ionization mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 15(5) (1991) 260-265.

164. Möller MR, Fey P, Rimbach S. Identification and quantitation of cocaine and its metabolites, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester, in hair of Bolivian coca chewers by gas chromatography/mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 16(5) (1992) 291-296.
165. Moeller MR, Fey P, Wennig R. Simultaneous determination of drugs of abuse (opiates, cocaine and amphetamine) in human hair by GC/MS and its application to a methadone treatment program. *Forensic Sci Int* 63(1-3) (1993) 185-206.
166. Edder P, Staub C, Veuthey JL, Pierroz I, Haerdi W. Subcritical fluid extraction of opiates in hair of drug addicts. *J Chromatogr B Biomed Appl* 658(1) (1994) 75-86.
167. Wang WL, Darwin WD, Cone EJ. Simultaneous assay of cocaine, heroin and metabolites in hair, plasma, saliva and urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Appl* 660(2) (1994) 279-290.
168. Cirimele V, Kintz P, Majdalani R, Mangin P. Supercritical fluid extraction of drugs in drug addict hair. *J Chromatogr B Biomed Appl* 673(2) (1995) 173-181.
169. Kintz P, Cirimele V, Sengler C, Mangin P. Testing human hair and urine for anhydroecgonine methyl ester, a pyrolysis product of cocaine. *J Anal Toxicol* 19(6) (1995) 479-482.
170. Kintz P, Mangin P. Simultaneous determination of opiates, cocaine and major metabolites of cocaine in human hair by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *Forensic Sci Int* 73(2) (1995) 93-100.
171. Gaillard Y, Pépin G. Simultaneous solid-phase extraction on C<sub>18</sub> cartridges of opiates and cocaine metabolites for an improved quantitation in human hair by GC-MS: one year of forensic applications. *Forensic Sci Int* 86(1-2) (1997) 49-59.
172. Höld KM, Wilkins DG, Rollins DE, Joseph RE Jr, Cone EJ. Simultaneous quantitation of cocaine, opiates, and their metabolites in human hair by positive ion chemical ionization gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr Sci* 36(3) (1998) 125-130.
173. Pichini S, Pacifici R, Altieri I, Pellegrini M, Zuccaro P. Determination of opiates and cocaine in hair as trimethylsilyl derivatives using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 23(5) (1999) 343-348.
174. Girod C, Staub C. Analysis of drugs of abuse in hair by automated solid-phase extraction, GC/EI/MS and GC ion trap/CI/MS. *Forensic Sci Int* 107(1-3) (2000) 261-271.

175. Jones J, Tomlinson K, Moore C. The simultaneous determination of codeine, morphine, hydrocodone, hydromorphone, 6-acetylmorphine, and oxycodone in hair and oral fluid. *J Anal Toxicol* 26(3) (2002) 171-175.
176. Montagna M, Poletti A, Stramesi C, Groppi A, Vignali C. Hair analysis for opiates, cocaine and metabolites. Evaluation of a method by interlaboratory comparison. *Forensic Sci Int* 128(1-2) (2002) 79-83.
177. Skender L, Karacić V, Brcić I, Bagarić A. Quantitative determination of amphetamines, cocaine, and opiates in human hair by gas chromatography/mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 125(2-3) (2002) 120-126.
178. Acampora A, Della Casa E, Martone G, Miraglia N. Determination of opiates in biological samples through the analysis of heptafluorobutyric derivatives by gas chromatography/negative ion chemical ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 38(9) (2003) 1007-1011.
179. de Toledo FC, Yonamine M, de Moraes Moreau RL, Silva OA. Determination of cocaine, benzoylecgonine and cocaethylene in human hair by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 798(2) (2003) 361-365.
180. Romolo FS, Rotolo MC, Palmi I, Pacifici R, Lopez A. Optimized conditions for simultaneous determination of opiates, cocaine and benzoylecgonine in hair samples by GC-MS. *Forensic Sci Int* 138(1-3) (2003) 17-26.
181. Gentili S, Cornetta M, Macchia T. Rapid screening procedure based on headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for the detection of many recreational drugs in hair. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 801(2) (2004) 289-296.
182. Lachenmeier K, Musshoff F, Madea B. Determination of opiates and cocaine in hair using automated enzyme immunoassay screening methodologies followed by gas chromatographic-mass spectrometric (GC-MS) confirmation. *Forensic Sci Int* 159(2-3) (2006) 189-199.
183. Cordero R, Paterson S. Simultaneous quantification of opiates, amphetamines, cocaine and metabolites and diazepam and metabolite in a single hair sample using GC-MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 850(1-2) (2007) 423-431.
184. Barroso M, Dias M, Vieira DN, Queiroz JA, López-Rivadulla M. Development and validation of an analytical method for the simultaneous determination of cocaine and its main metabolite,

benzoylecgonine, in human hair by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 22(20) (2008) 3320-6.

185. Wu YH, Lin KL, Chen SC, Chang YZ. Simultaneous determination of amphetamines, ketamine, opiates and metabolites in human hair by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 22(6) (2008) 887-897.

186. Wu YH, Lin KL, Chen SC, Chang YZ. Integration of GC/EI-MS and GC/NCI-MS for simultaneous quantitative determination of opiates, amphetamines, MDMA, ketamine, and metabolites in human hair. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 870(2) (2008) 192-202.

187. Moller M, Aleksa K, Walasek P, Karaskov T, Koren G. Solid-phase microextraction for the detection of codeine, morphine and 6-monoacetylmorphine in human hair by gas chromatography-mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 196(1-3) (2010) 64-9.

188. Barroso M, Dias M, Vieira DN, López-Rivadulla M, Queiroz JA. Simultaneous quantitation of morphine, 6-acetylmorphine, codeine, 6-acetylcodeine and tramadol in hair using mixed-mode solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 396(8) (2010) 3059-3069.

189. Sunshine I. Recent developments in therapeutic drug monitoring and clinical toxicology. Palo Alto, California, 1992, 555-563.

190. Blank DL, Kidwell DA. Decontamination procedure for drugs of abuse in hair: are they sufficient? *Forensic Sci Int* 70(1-3) (1995) 13-38.



# Capítulo

# 5

## Introducción: Metodología GC-MS





## Capítulo 5. Introducción: Metodología GC-MS

<b>5.1</b>	CROMATOGRAFÍA DE GASES .....	147
<b>5.1.1</b>	GAS PORTADOR Y SISTEMA DE CONTROL DE FLUJO .....	148
<b>5.1.2</b>	HORNO CROMATOGRÁFICO .....	149
<b>5.1.3</b>	COLUMNA CROMATOGRÁFICA .....	150
<b>5.1.4</b>	INYECTOR .....	150
<b>5.1.5</b>	DETECTOR .....	152
<b>5.2</b>	INTERFASE .....	153
<b>5.3</b>	ESPECTROMETRÍA DE MASAS .....	153
<b>5.3.1</b>	FUENTE DE IONIZACIÓN .....	153
<b>5.3.1.1</b>	IONIZACIÓN POR IMPACTO ELECTRÓNICO .....	154
<b>5.3.2</b>	ANALIZADOR DE MASAS .....	155
<b>5.3.3</b>	DETECTOR DE IONES .....	157
<b>5.3.4</b>	FUENTE DE VACÍO .....	157
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	159

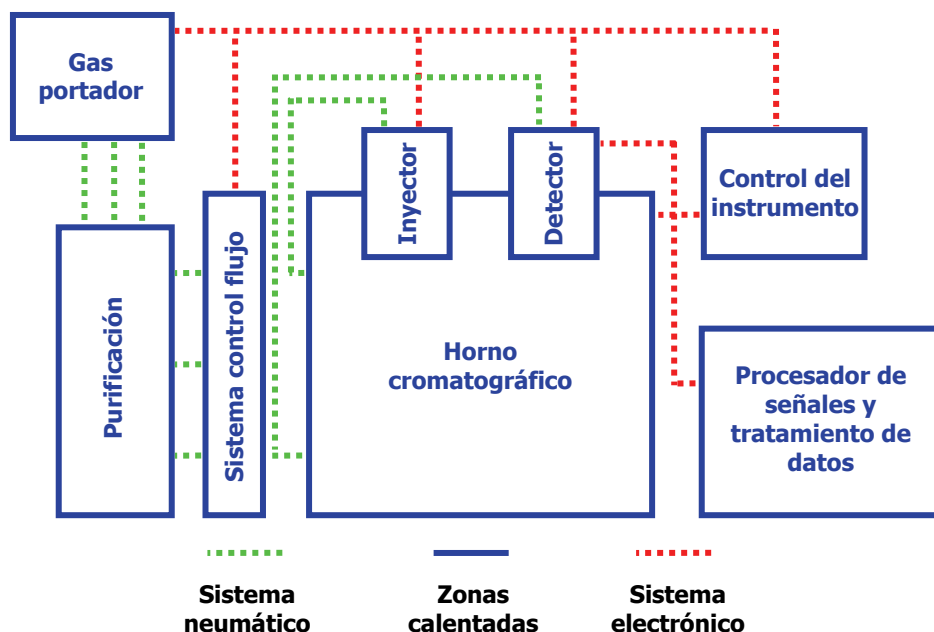


## 5.1 CROMATOGRAFÍA DE GASES

Un cromatógrafo de gases es un instrumento cuya función principal es la de proporcionar las condiciones requeridas por la columna cromatográfica para lograr la separación de los componentes de interés. Esto implica:

- Proporcionar gas portador de modo controlado a la columna y al sistema de inyección de las muestras.
- Disponer de un horno termostatzado para optimizar las condiciones de temperatura.
- Disponer de uno o más sistemas de detección en línea para producir la información cualitativa y cuantitativa requerida.
- Disponer de la electrónica, sistemas de control, monitorización, registro y almacenamiento de la información necesarios<sup>1</sup>.

Los elementos básicos de un cromatógrafo de gases se representan en el esquema siguiente (Figura 5.1).



**Figura 5.1.** Diagrama esquemático de los componentes instrumentales de un cromatógrafo de gases.

### 5.1.1 GAS PORTADOR Y SISTEMA DE CONTROL DE FLUJO

El gas portador debe ser un gas inerte para prevenir su reacción con el analito o la columna. Generalmente se emplean gases como el helio, argón, nitrógeno, hidrógeno o dióxido de carbono, y la elección de este gas en ocasiones depende del tipo de detector empleado. El almacenaje del gas puede ser en balas normales o empleando un generador, especialmente en el caso del nitrógeno y del hidrógeno. Para garantizar un flujo estable y un sistema de deshidratación del gas, se usa un sistema de manómetros y reguladores de flujo, como puede ser un tamiz molecular.

Una de las características básicas que debe poseer todo gas portador es una elevada pureza, puesto que la presencia de trazas de oxígeno o de agua en la fase móvil va a provocar la degradación de la fase estacionaria. Por otro lado, la presencia de otros compuestos, tales como hidrocarburos, pueden provocar líneas base muy ruidosas o la

aparición de picos fantasma. Para evitar estos problemas, aparte de emplear gases de pureza elevada, es recomendable la instalación de purificadores entre la fuente del gas portador y el cromatógrafo. Su papel es adsorber o destruir contaminantes en el gas portador.

El flujo de gas portador también afecta a la eficacia de las separaciones y, lógicamente, a la reproducibilidad de los tiempos de retención. Generalmente, la regulación de la presión se hace a dos niveles: un primer manómetro se sitúa a la salida de la bala o generador del gas, y el otro, a la entrada del cromatógrafo, donde se regula el flujo. Las presiones de entrada varían entre 10 y 60 psi, lo que da lugar a caudales de 25 a 150 mL/min en columnas de relleno y de 1 a 25 mL/min en columnas capilares. Para comprobar el caudal se puede utilizar un rotámetro, o un simple medidor de bombas de jabón, el cual da una medida muy exacta del caudal volumétrico que entra a la columna.

### 5.1.2 HORNO CROMATOGRÁFICO

El horno cromatográfico es normalmente un sistema de calefacción por circulación forzada de aire, diseñado de manera que pueda alojar convenientemente dos o más columnas, y que permite el acceso necesario para su instalación e intercambio, pero a la vez reduciendo al mínimo los espacios innecesarios y garantizando la inexistencia de zonas de diferente temperatura, puntos fríos o calientes próximos a la columna, etc. Normalmente, se exige una estabilidad de 0,1°C en el tiempo y variaciones no superiores a 1°C entre las diferentes zonas del horno. Las columnas capilares tienen una excelente conductividad térmica, que hace posible el empleo de gradientes rápidos de temperatura, pero, a la vez, provoca que las inestabilidades de la temperatura del horno afecten rápidamente a la fase, y con ello, a las separaciones. En la actualidad, la práctica totalidad de los instrumentos comerciales disponen de microprocesadores que se encargan del control de la temperatura y su monitorización durante la operación, garantizando así que este elemento, partiendo de que se ha diseñado apropiadamente, no compromete la calidad de las separaciones. Por otra parte, el control preciso de la temperatura es el elemento fundamental para trabajar en elución a temperatura programada<sup>1</sup>.

El rango de trabajo de un horno cromatográfico suele encontrarse entre la temperatura ambiente y los 400-450°C. En la práctica, el rango de temperaturas de trabajo está controlado por el punto de fusión y la presión de vapor de la fase estacionaria utilizada.

### **5.1.3 COLUMNA CROMATOGRÁFICA**

En GC se usan dos tipos generales de columnas, las abiertas o capilares, y las rellenas<sup>2</sup>. En las primeras, la fase estacionaria se deposita sobre las paredes internas del tubo, mientras que en las segundas se deposita sobre partículas sólidas que rellenan completamente el interior de la columna. Además, dentro de cada uno de los grupos anteriores se pueden establecer subdivisiones en base al diámetro del tubo, la disposición de la fase estacionaria, su estado físico e incluso el material del tubo.

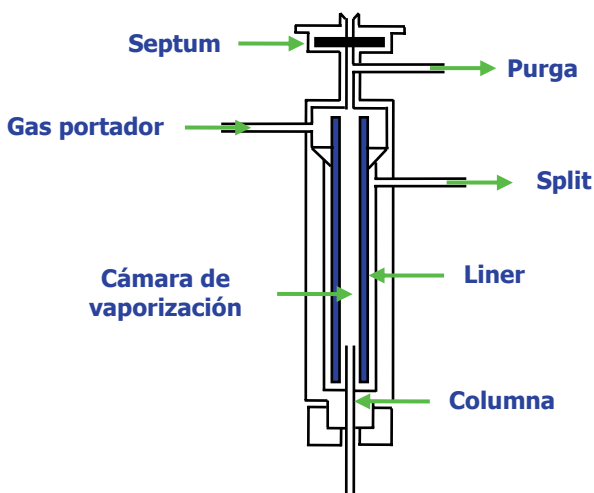
Las columnas abiertas o capilares son de dos tipos básicos, denominados columna abierta de pared recubierta y columna abierta recubierta con soporte. Las columnas de pared recubierta son simplemente capilares con la pared interna recubierta de una fina capa de fase estacionaria. En las recubiertas con soporte, la superficie interna del capilar está revestida de una capa delgada ( $\sim 30 \mu\text{m}$ ) de material soporte, tal como tierra de diátomeas. Este tipo de columnas contiene varias veces la fase estacionaria que tiene una columna de pared recubierta y, por tanto, tiene una mayor capacidad de carga. Generalmente, la eficacia de una columna recubierta con soporte es menor que la de una de pared recubierta, pero es sensiblemente mayor que la de una columna rellena<sup>2</sup>.

### **5.1.4 INYECTOR**

El inyector constituye uno de los principales elementos en cualquier equipo de GC y muchas veces es el responsable de un gran número de parámetros analíticos, tales como, los límites de detección del método y la eficacia de las separaciones. La elección de uno u otro tipo de inyector depende de varios parámetros, entre los que deben considerarse los siguientes: estado físico de la muestra (líquido o gas), diferencia de volatilidad entre los analitos de interés y el resto de componentes de la matriz, nivel de concentración de los analitos y dimensiones (diámetro) de la columna cromatográfica.



En la Figura 5.2 se muestra un inyector de split/splitless para muestras líquidas como el utilizado en esta Tesis, en este caso, la muestra se volatiliza en una cámara de vidrio o cuarzo termostatzada a una temperatura adecuada. La inyección se realiza a través de un septum de silicona utilizando una microjeringa para muestras líquidas.



**Figura 5.2.** Inyector de muestra para un GC.

En la modalidad con división de flujo (modo *split*), el gas portador que arrastra la muestra volatilizada se divide en dos partes: una pasa a columna y la otra se envía al exterior a través de la válvula de purga. En general, es sólo útil para la determinación de los componentes mayoritarios presentes en una muestra. Su principal ventaja radica en que la transferencia de los analitos a cabeza de columna es muy rápida, por tanto, la contribución de la inyección al ensanchamiento de las bandas cromatográficas es mínima.

El modo *splitless* (sin división de flujo) es útil para la determinación de compuestos minoritarios, en este caso, la mayor parte de la muestra volatilizada en el inyector es arrastrada a cabeza de columna. El proceso se desarrolla en dos etapas: durante los instantes iniciales (30 a 120 seg) la válvula de purga permanece cerrada. La muestra se volatiliza lentamente en el inyector y es arrastrada por el gas portador hacia cabeza de columna. A continuación, la válvula de purga se abre, el sistema cambia a modo *split* y elimina los restos de muestra presentes en el inyector.

### 5.1.5 DETECTOR

El detector es el sistema encargado de poner de manifiesto la presencia de solutos o componentes de la muestra que abandonan el sistema<sup>1</sup>. Las características de un detector ideal son:

- Adecuada sensibilidad. En general, las sensibilidades de los detectores actuales se encuentran en el intervalo de  $10^{-15}$  a  $10^{-8}$  g de soluto/s.
- Buena estabilidad y reproducibilidad.
- Respuesta lineal para los solutos, que se extiende a varios órdenes de magnitud.
- Intervalo de temperaturas de trabajo comprendido desde la temperatura ambiente hasta al menos 400°C.
- Tiempo de respuesta corto que sea independiente del caudal.
- Alta fiabilidad y manejo sencillo. Hasta el punto que el detector debería estar a prueba de la impericia de operadores inexpertos.
- Respuesta semejante para todos los solutos o, por el contrario, una respuesta selectiva y altamente predecible para uno o más tipos de solutos.
- No destructivo de la muestra<sup>2</sup>.

Los métodos fundamentales de detección están basados en procesos de ionización: detector de ionización de llama (FID, *Flame Ionization Detector*), detector de ionización termoiónica (TID, *ThermoIonic Detector*) y NPD, detector de fotoionización (PID, *Photo Ionization Detector*), detector de captura electrónica (ECD, *Electron Capture Detector*), detector de ionización de helio (HID, *Helium Ionization Detector*); cambios en alguna propiedad física: detector de conductividad térmica (TCD, *Thermal Conductivity Detector*); emisión de radiación: detector fotométrico de llama (FPD, *Flame Photometric Detector*), detector de emisión atómica (AED, *Atomic Emission Detector*), detector de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR, *Fourier-Transform Infrared*), detector

selectivo de masas (MSD, *Mass Selective Detector*) o procesos electroquímicos: detector de conductividad electrolítica (ELCD, *Electrolytic Conductivity Detector*)<sup>1</sup>.

## 5.2 INTERFASE

La conectividad entre la GC y la MS se consigue fácilmente gracias a que ambas trabajan en fase gaseosa y requieren una cantidad muy pequeña de muestra para realizar el análisis. La interfase debe transferir cuantitativamente todo el analito y reducir el flujo de gas portador para obtener un vacío apropiado, para que pueda operar el espectrómetro de masas. El único obstáculo que presenta este acoplamiento directo es la diferencia de presiones entre: atmosférica a la salida de la columna y un alto vacío a la entrada del espectrómetro de masas, pero se solventa con el empleo de columnas capilares, que al requerir flujos de gas portador de solo 1-2 mL/min, son tolerados perfectamente por el espectrómetro de masas.

## 5.3 ESPECTROMETRÍA DE MASAS

En la MS, las moléculas gaseosas son ionizadas, aceleradas en un campo eléctrico y por último separadas en función de la masa. Los elementos principales de un espectrómetro de masas son los siguientes: fuente de ionización, analizador de masas, detector de iones y fuente de vacío.

### 5.3.1 FUENTE DE IONIZACIÓN

La fuente de ionización es la encargada de provocar la ionización de la molécula, bien por impacto electrónico (EI, *Electron Impact*) o por ionización química (CI, *Chemistry Ionization*). El método de ionización más antiguo, universal, reproducible y más ampliamente utilizado para muestras gaseosas, es la ionización por EI. Existen equipos que disponen de ionización por EI y CI, que además permiten el uso simultáneo de ambos. Este cambio de una a otra ionización se consigue en intervalos extremadamente pequeños de tiempo, lo que permite obtener ambos espectros simultáneamente (EI y CI) de cada pico cromatográfico.

### 5.3.1.1 IONIZACIÓN POR IMPACTO ELECTRÓNICO

En la ionización por EI, la muestra en fase gaseosa se introduce en la cámara de ionización, donde las moléculas son bombardeadas con electrones produciéndose choques. Si la energía de estos electrones es superior al potencial de ionización de la molécula, ésta se ioniza positivamente formando el ión molecular y liberando un electrón. Si el choque se produce de una forma muy eficaz, la energía comunicada por el electrón está en exceso, provocando la rotura de uno o más enlaces del ión molecular y generándose una fragmentación característica de esa molécula. Este patrón de fragmentación específico es la considerada *huella digital* de la molécula y nos sirve para certificar su identificación.

Por lo general, tras el proceso de ionización se forman iones positivos con una sola carga, aunque en algunos casos se pueden llegar a formar iones negativos, sobretodo, en moléculas que contengan átomos muy electronegativos, como por ejemplo, los halógenos. Mucho menos frecuente es la formación de iones con dos o tres cargas, que se forman en cantidades despreciables, debido a la baja eficacia del proceso.

La eficacia en la ionización de la molécula depende de la molécula a determinar, pero aumenta con la energía de los electrones. Por convenio universal, se ha adoptado el valor de 70 eV como energía electrónica estándar para poder comparar directamente los espectros producidos en diferentes laboratorios y de esta forma editar espectrotecas o librerías de espectros.

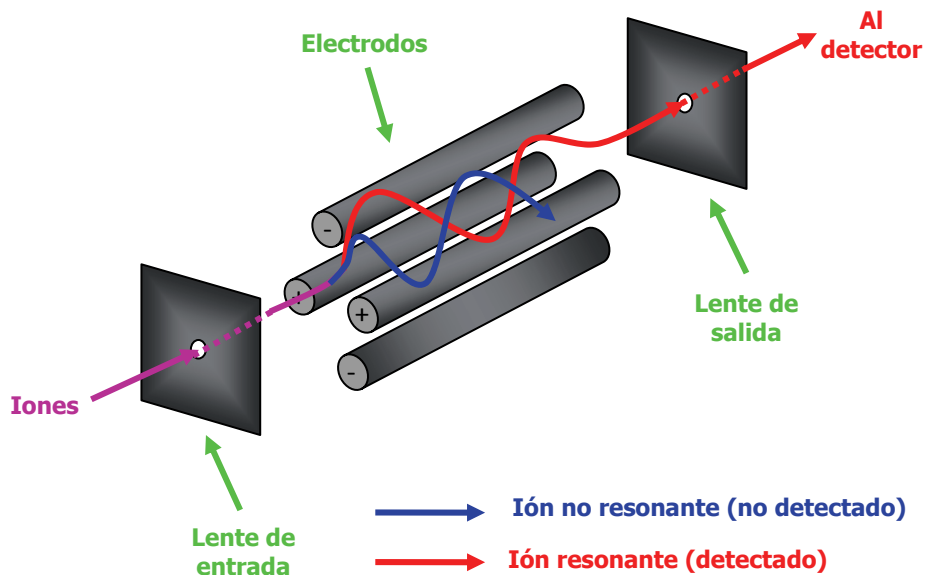
Otro factor a tener en cuenta es la temperatura de la fuente de ionización, ya que afecta al proceso de fragmentación, aunque este efecto está ligado a la estructura de los compuestos. No es posible, por tanto, establecer una temperatura de trabajo general, pero es necesaria una temperatura elevada, no sólo para favorecer la ionización de las moléculas de la muestra que entran en la fuente, sino para mantenerlas en estado gas, evitando la contaminación de compuestos de baja volatilidad.

### 5.3.2 ANALIZADOR DE MASAS

Una vez generados los iones, éstos deben ser separados en función de su relación masa/carga. En general, todos los iones se aceleran con la misma energía cinética. Algunos aspectos de estos iones acelerados sirven de base para su resolución.

Los analizadores más empleados en equipos acoplados a cromatógrafos de gases son los siguientes:

- Magnético: los iones se aceleran empleando un potencial y se hacen pasar por un campo magnético perpendicular por la línea de vuelo del ión. Al pasar por este campo, los iones siguen un camino circular cuyo radio es proporcional al valor masa/carga ( $m/z$ ) del ión.
- Tiempo de vuelo: los iones se mueven en línea recta dentro del "tubo de vuelo", alcanzando velocidades distintas y llegando al detector en orden creciente de masas.
- Cuadrupolar (Figura 5.3): consiste en dos pares de electrodos alineados paralelamente entre sí, que pueden ser de sección hiperbólica, elíptica o circular. Mediante la aplicación a cada pareja de electrodos opuestos de un voltaje y radiofrecuencias específicos, podemos ir enfocando a través de este túnel los distintos iones según su valor de  $m/z$ .



**Figura 5.3.** Diagrama de un espectrómetro de masas cuadrupolar.

- Trampa iónica: consiste en un sistema de tres electrodos anulares de superficie hiperbólica o circular, en los que al aplicar radiofrecuencias los iones quedan atrapados en su interior describiendo órbitas circulares estables. Incrementando el potencial de esta radiofrecuencia se desestabiliza la órbita de estos iones y salen de la trampa al detector secuencialmente según su valor de  $m/z$ .

La elección del analizador más adecuado siempre va a depender del uso que se vaya hacer de él, de las necesidades de sensibilidad, de la versatilidad de su uso, del personal disponible y cómo no del coste que seamos capaces de asumir.

El empleo de detectores de masas en cromatografía permite varias modalidades de medida, siendo las más tradicionales:

- Full Scan: se realiza un barrido completo de la muestra obteniendo un registro total de todos los iones.
- SIM: se registra de forma continua la presencia de uno o varios iones previamente seleccionados.

En analizadores de masas de sector magnético o de cuadrupolo, el empleo del modo SIM conlleva un notable aumento de la sensibilidad respecto al modo Full Scan; pero en equipos de trampa iónica no existe una mejora significativa de sensibilidad. Para incrementar la sensibilidad en equipos de trampa iónica se recurre al uso de la modalidad tándem masas.

### 5.3.3 DETECTOR DE IONES

Una vez separados los iones en el analizador se requiere un detector, que suele ser un multiplicador de electrones tipo dínodo continuo, es decir, un cátodo (-) en forma de embudo que finaliza en un ánodo (+). Los iones positivos son atrapados por el cátodo a medida que son expulsados de la trampa y golpean al cátodo arrancando electrones de su superficie interna, que está compuesta por un material electroemisor. Debido al potencial creciente, estos electrones son empujados hacia el ánodo chocando con las paredes y arrancando nuevos electrones de la superficie curva. La señal de los iones es proporcional al número de electrones y se ajusta el voltaje del multiplicador para obtener  $10^5$  electrones por cada uno que se forma inicialmente en el cátodo.

### 5.3.4 FUENTE DE VACÍO

La MS tiene lugar sólo en condiciones de alto vacío para garantizar que la fragmentación sea predecible y reproducible y para garantizar una alta sensibilidad. Normalmente, en los espectrómetros de masas empleados como detectores de GC se requieren  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  torr. Los detectores están diseñados para trabajar a vacío por lo que este mismo vacío se emplea como aislante.

Para alcanzar estos niveles de vacío hay que combinar dos tipos de bombas. Una primera, generalmente rotatoria, que genera un vacío de  $10^{-2}$ - $10^{-4}$  torr, y una segunda que puede ser turbomolecular o difusora, con la que se llega a  $10^{-5}$  torr. Una bomba turbomolecular gira a 30000-90000 rpm provocando la expulsión de las moléculas de gas hacia la bomba rotatoria (esta debe purgarse con regularidad).

El salto de presión que hay que salvar cuando se hibridan GC y MS se soluciona fácilmente cuando se trabaja con columnas capilares, que es actualmente el 95% de los casos. El flujo de gas portador es inferior a 3 mL/min, por lo que el extremo de la columna se introduce directamente en el interior de la fuente de iones, dando lugar a una interfase directa. La mayor ventaja de esta interfase es que se garantiza que toda la muestra entra en la cámara de ionización (sensibilidad). Sin embargo, su mayor desventaja en la práctica aparece cuando hay que cambiar la columna, ya que para esto hay que, en primer lugar, romper el vacío y después realinear el extremo de la columna en la fuente (falta de reproducibilidad). Por otra parte, si toda la muestra penetra en la fuente puede producirse contaminación de esta o afectación de los componentes como el filamento, los electrodos o el detector.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cela R, Lorenzo RA, Casais MC. Técnicas de separación en Química Analítica. Madrid, Síntesis, 2002, 346-367.
2. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Principios de análisis instrumental. Madrid, McGraw-Hill, 2003, 759-784.



# Capítulo

# 6

## Justificación y objetivos



En las últimas décadas el consumo de drogas durante el período de gestación ha sido objeto de numerosos estudios debido al significativo impacto que estas sustancias ejercen sobre la salud y el desarrollo neonatal. Por este motivo, la principal finalidad de esta Tesis Doctoral ha sido demostrar la posibilidad de utilización de muestras biológicas alternativas para la detección precoz del consumo de drogas durante el período de gestación, concretamente el pelo y el meconio.

Las sustancias psicoactivas, incluidas las drogas de abuso, atraviesan con facilidad la barrera placentaria al tener las mismas propiedades que les permiten cruzar la barrera hematoencefálica, esto es, bajo peso molecular, baja polaridad y gran liposolubilidad. Además, la mayor parte de las drogas tiene una vida media más larga en el feto que en la madre, al no existir una maduración completa de las vías metabólicas del feto, por lo que los procesos de desarrollo embrionario pueden verse seriamente afectados.

Son múltiples los efectos que los neonatos pueden sufrir por haber estado expuestos a drogas durante el período de gestación. Así, a corto plazo, sufren con frecuencia expulsión y posterior aspiración de meconio, presentan un test de Apgar bajo, prematuridad, bajo peso, reducción del perímetro craneal, etc., siendo el síntoma más frecuente el síndrome de abstinencia a drogas del recién nacido, cuya aparición, duración e intensidad dependen del tipo de droga consumida y del intervalo transcurrido desde el último consumo hasta el momento del parto. Además pueden surgir problemas tardíos como alteraciones en el comportamiento, retrasos en la maduración, etc., observándose una mayor incidencia de casos de muerte súbita del lactante.

Muchas veces existe dificultad para identificar a estos recién nacidos que estuvieron expuestos a drogas durante el período de gestación, con el riesgo de ser dados de alta hospitalaria y sufrir posteriormente problemas médicos y sociales más o menos importantes, por lo que se hace necesaria la detección precoz de este problema.

Tanto la entrevista materna como el análisis de la orina de la madre y/o del neonato, han demostrado ser poco útiles para este fin, bien por la poca fiabilidad de las declaraciones de las mujeres gestantes o por la corta vida media de eliminación de la mayoría de las drogas de abuso. Por ello, es necesario recurrir a otras muestras

biológicas que permitan detectar el consumo aún cuando hayan transcurrido varias semanas y que, además, ayuden a reflejar el efecto acumulativo de la exposición.

En este sentido cabe destacar los estudios realizados en los últimos años sobre la utilidad del pelo de la madre y/o del recién nacido y el meconio, como muestras biológicas idóneas para la detección del consumo de drogas durante el período de gestación.

La ventaja de los análisis de pelo se basa en el hecho de que el tallo del pelo es un tejido sin metabolismo, por lo que estas sustancias permanecen almacenadas en el mismo prácticamente sin variación durante un largo periodo de tiempo. Tanto las diferentes drogas como sus principales metabolitos se incorporan al pelo desde el torrente sanguíneo y permanecen allí de forma estable e indefinida, proporcionando un período de detección mucho mayor con respecto a otros fluidos biológicos.

El vello púbico materno es una muestra muy utilizada en la detección de drogas en el embarazo debido a que se puede obtener fácilmente del rasurado en el momento del parto, sin embargo, en muchas ocasiones no permite diferenciar entre un consumo previo al embarazo o durante el mismo. Esto es debido a que en la mayoría de las ocasiones este pelo no se renueva, por lo que una vez llegado a su largo tope (variable según los individuos), éste no sigue creciendo y las drogas se acumulan en él durante largos periodos de tiempo (probablemente varios años), por lo que no se puede utilizar para fijar la fecha de consumo.

Por este motivo, otra muestra muy útil para este fin es el cabello del neonato, que empieza a aparecer alrededor de la veintava semana del embarazo, y por lo tanto informa del consumo materno de los últimos cuatro meses, lo cual nos permite limitar la ventana de detección a las últimas 16 semanas de gestación.

Las primeras heces expulsadas por el recién nacido (meconio) empiezan a formarse entre la duodécima y la decimosexta semana de gestación y son depósito acumulativo a partir de entonces. Por ello permiten ampliar la ventana de detección del consumo de drogas, aproximadamente, hasta los dos últimos trimestres del embarazo.

La recogida no traumática de ambas muestras (pelo y meconio) ha hecho posible la realización de estudios epidemiológicos a gran escala y dilatados en el tiempo, permitiéndonos conocer el consumo de drogas en mujeres en el momento del parto.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, los objetivos de esta Tesis Doctoral han sido:

1. Puesta a punto de la metodología analítica necesaria para realizar la investigación toxicológica de COC, BE, COD, MOR, 6-MAM en pelo y meconio mediante GC-MS.
2. Aplicación de los métodos desarrollados a muestras de vello púbico materno, cabello del recién nacido y meconio, con el fin de verificar cuál de las muestras objeto de estudio resulta más idónea para demostrar el consumo de drogas de abuso durante la gestación y la consiguiente exposición prenatal a drogas.
3. Intentar relacionar el consumo de drogas de abuso durante la gestación con las diversas patologías presentadas por el feto.





The background of the slide is a photograph of a laboratory setting. It features several glass bottles and containers. On the left, there are white plastic bottles with green caps, labeled 'SOCOREX' and 'CALIBREX 520'. In the center, a dark bottle is labeled 'Metanol (SPE)'. To the right, a glass bottle with a scale from 50 to 200 is visible. In the foreground, there are more glass bottles, some with blue caps, and a white tube connected to one of them. The overall scene is a typical laboratory environment for chemical analysis.

# Capítulo

# 7

**Experimental:**  
Determinación de cocaína  
y opioides en pelo por  
GC-MS



## Capítulo 7. Experimental: Determinación de cocaína y opioides en pelo por GC-MS

<b>7.1</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	171
<b>7.1.1</b>	<b>INSTRUMENTACIÓN</b> .....	171
<b>7.1.1.1</b>	<b>INSTRUMENTACIÓN PARA LA PREPARACIÓN Y EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA</b> .....	171
<b>7.1.1.2</b>	<b>INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA</b> .....	172
<b>7.1.1.2.1</b>	<b>CROMATÓGRAFO DE GASES</b> .....	172
<b>7.1.1.2.2</b>	<b>ESPECTRÓMETRO DE MASAS</b> .....	172
<b>7.1.1.2.3</b>	<b>SOPORTE INFORMÁTICO</b> .....	172
<b>7.1.2</b>	<b>MATERIAL DE LABORATORIO</b> .....	172
<b>7.1.3</b>	<b>REACTIVOS</b> .....	173
<b>7.1.4</b>	<b>PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES</b> .....	174
<b>7.1.4.1</b>	<b>PREPARACIÓN DE TAMPONES Y SOLUCIONES</b> .....	174
<b>7.1.4.2</b>	<b>PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES MADRE</b> .....	175
<b>7.1.4.3</b>	<b>PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES DE TRABAJO</b> .....	175
<b>7.1.5</b>	<b>CONDICIONES DEL CROMATÓGRAFO DE GASES</b> .....	175
<b>7.1.6</b>	<b>CONDICIONES DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS</b> .....	176
<b>7.1.7</b>	<b>RECOGIDA Y RECEPCIÓN DE LAS MUESTRAS</b> .....	176
<b>7.1.8</b>	<b>TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS</b> .....	177
<b>7.1.8.1</b>	<b>PREPARACIÓN</b> .....	177
<b>7.1.8.2</b>	<b>HIDRÓLISIS</b> .....	177
<b>7.1.8.3</b>	<b>PROCESO DE EXTRACCIÓN</b> .....	178
<b>7.1.8.4</b>	<b>DERIVATIZACIÓN</b> .....	179
<b>7.1.9</b>	<b>VALIDACIÓN DEL MÉTODO</b> .....	179
<b>7.1.9.1</b>	<b>SELECTIVIDAD</b> .....	180
<b>7.1.9.2</b>	<b>MODELO DE CALIBRACIÓN (LINEALIDAD)</b> .....	181
<b>7.1.9.3</b>	<b>LÍMITES</b> .....	182
<b>7.1.9.4</b>	<b>PRECISIÓN</b> .....	183
<b>7.1.9.5</b>	<b>EXACTITUD</b> .....	184
<b>7.1.9.6</b>	<b>RENDIMIENTO</b> .....	184

7.1.10	APLICACIÓN A CASOS REALES .....	185
7.2	RESULTADOS .....	185
7.2.1	CONDICIONES DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS .....	185
7.2.2	SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA .....	190
7.2.3	RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN .....	191
7.2.3.1	SELECTIVIDAD.....	191
7.2.3.2	LINEALIDAD, LÍMITES, PRECISIÓN, EXACTITUD Y RENDIMIENTO	192
7.2.4	APLICACIÓN A CASOS REALES .....	194
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	195

El trabajo que a continuación se detalla ha sido publicado<sup>1</sup> y dicha publicación se anexa al final de este capítulo.

## **7.1 MATERIAL Y MÉTODOS**

### **7.1.1 INSTRUMENTACIÓN**

#### **7.1.1.1 INSTRUMENTACIÓN PARA LA PREPARACIÓN Y EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA**

- ✓ Agitador rotativo Orbit 12 rpm (*Selecta*<sup>®</sup>).
- ✓ Estufa (*Selecta*<sup>®</sup>).
- ✓ Tijeras.
- ✓ Balanza analítica digital BP61S (*Sartorius*<sup>®</sup>).
- ✓ Pipetas automáticas (*Gilson*<sup>®</sup> y *Eppendorf*<sup>®</sup>).
- ✓ pHmetro digital Basic 20 (*Crison*<sup>®</sup>).
- ✓ Agitador magnético HI 190M (*Hamma Instruments*<sup>®</sup>).
- ✓ Sistema de purificación de agua Milli-Q (*Millipore*<sup>®</sup>).
- ✓ Vórtex Reax 2000 (*Heidolph*<sup>®</sup>).
- ✓ Sistema manual de SPE Visiprep<sup>TM</sup> DL (*Supelco*<sup>®</sup>).
- ✓ Termostato de bloque metálico para 24 tubos con suministro múltiple de nitrógeno VLM EC1 (*VLM*).
- ✓ Baño de ultrasonidos (*Selecta*<sup>®</sup>).

### **7.1.1.2 INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA**

#### **7.1.1.2.1 CROMATÓGRAFO DE GASES**

El sistema cromatográfico empleado ha sido un cromatógrafo de gases *HP 6890 Series* (Hewlett-Packard®). Como columna cromatográfica se ha utilizado una columna capilar HP-5 de 30 metros de longitud y 250 µm de diámetro interno, recubierta internamente por una capa de fenilmetilsiloxano al 5%, con un espesor de 0,25 µm (*Agilent*®).

#### **7.1.1.2.2 ESPECTRÓMETRO DE MASAS**

El espectrómetro de masas empleado ha sido un *HP 5973 Inert* (Hewlett-Packard®).

#### **7.1.1.2.3 SOPORTE INFORMÁTICO**

Se ha utilizado un ordenador *HP Compaq d530 SFF* (Hewlett-Packard®) con sistema operativo Windows XP. El software de manejo y comunicación del sistema ha sido el *ChemStation Versión G1701DA*.

### **7.1.2 MATERIAL DE LABORATORIO**

- ✓ Botes de cristal ámbar de 8 mL para el almacenamiento de disoluciones patrón.
- ✓ Matraces aforados.
- ✓ Probetas.
- ✓ Vasos de precipitados.
- ✓ Pipetas Pasteur.
- ✓ Vidrios de reloj.
- ✓ Tubos Pyrex® redondos.
- ✓ Tubos Pyrex® cónicos.

- ✓ Columnas de extracción Waters Oasis® HLB 3cc (60 mg).
- ✓ Frascos lavadores.
- ✓ Espátulas.
- ✓ Gradillas.
- ✓ Jeringa de inyección de 10 µL (*Hewlett-Packard®*).

### 7.1.3 REACTIVOS

- ✓ Agua Milli-Q.
- ✓ Acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) de grado gradiente (*Merck®*).
- ✓ Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) de grado gradiente (*Merck®*).
- ✓ Ácido clorhídrico (HCl) 25% para análisis (*Merck®*).
- ✓ Tris-(hidroximetil)-aminometano (TRIS,  $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ) (*Scharlau®*).
- ✓ 1,4-Ditiotreitol (DTT,  $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$ ) (*Merck®*).
- ✓ Pronasa E (*Merck®*).
- ✓ Ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) para análisis (*Merck®*).
- ✓ Cloruro potásico (KCl) para análisis (*Merck®*).
- ✓ Hidróxido sódico (NaOH) en lentejas para análisis (*Merck®*).
- ✓ Hidróxido amónico ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) 25% para análisis (*Merck®*).
- ✓ Ácido acético glacial ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) 100% para análisis (*Merck®*).
- ✓ Clorotrimetilsilano (TMCS,  $\text{C}_3\text{H}_9\text{ClSi}$ ) para cromatografía de gases (*Merck®*).

- ✓ N,O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA,  $C_8H_{18}F_3NOSi$ ) (*Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>).
- ✓ Tween<sup>®</sup> 80 (*Panreac*<sup>®</sup>).
- ✓ COC, BE, COD, MOR y 6-MAM en forma sólida (*Lipomed*<sup>®</sup>).
- ✓ COC-d<sub>3</sub>, BE-d<sub>3</sub>, COD-d<sub>3</sub>, MOR-d<sub>3</sub> y 6-MAM-d<sub>3</sub> en disolución, 100 µg/mL (*Cerilliant*<sup>®</sup>).

## **7.1.4 PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES**

### **7.1.4.1 PREPARACIÓN DE TAMPONES Y SOLUCIONES**

- ✓ HCl 0,1 N: Se tomaron 12,96 mL de HCl al 25% y se diluyeron hasta 1 L con agua Milli-Q.
- ✓ Tampón Tris 0,1 M; pH 7,2: Se pesaron 1,21 g de TRIS y se disolvieron en 100 mL de agua Milli-Q. A continuación se mezclaron 50 ml de esta disolución con 44,7 mL de HCl 0,1 N enrasando hasta 100 mL con agua Milli-Q.
- ✓ DTT 12 mg/mL: Se pesaron 300 mg de DTT y se disolvieron con el tampón Tris pH 7,2 hasta un volumen de 25 mL.
- ✓ Pronasa 2 mg/mL: Se pesaron 50 mg de Pronasa E y se disolvieron con el tampón Tris pH 7,2 hasta un volumen de 25 mL.
- ✓ Tampón borato, pH 9: Se pesaron 6,2 g de  $H_3BO_3$  y 7,5 g de KCl. En un matraz aforado de 1 L se añadieron los dos sólidos y 420 mL de NaOH 0,1 M (2 g de NaOH en 500 mL de agua) enrasando hasta 1 L con agua Milli-Q. Se comprobó el pH y cuando fue necesario se ajustó con NaOH o HCl diluidos.
- ✓ Agua:metanol (95:5, v/v): Se midieron 25 mL de metanol y se enrasaron con agua en un matraz aforado de 500 mL.
- ✓ Agua:metanol:NH<sub>4</sub>OH (80:18:2, v/v/v): Se midieron 1 mL de NH<sub>4</sub>OH y 9 mL de metanol y se enrasaron con agua en un matraz de 50 mL.



- ✓ Metanol:ácido acético (98:2, v/v): Se midieron 10 mL de ácido acético y se enrasaron con metanol en un matraz de 500 mL
- ✓ BSTFA-TMCS (99:1, v/v): La disolución de derivatizante se preparó diariamente tomando 99 partes de BSTFA y 1 parte de TMCS.

#### **7.1.4.2 PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES MADRE**

A partir de las sustancias patrón en estado sólido se prepararon las denominadas disoluciones madre. En la balanza analítica se pesaron 5 mg del patrón y se disolvieron en 5 mL de metanol, excepto para la COC y la 6-MAM que se disolvieron en acetonitrilo, resultando así una disolución madre de 1 mg/mL. Estas disoluciones fueron almacenadas a 4°C y protegidas de la luz.

#### **7.1.4.3 PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES DE TRABAJO**

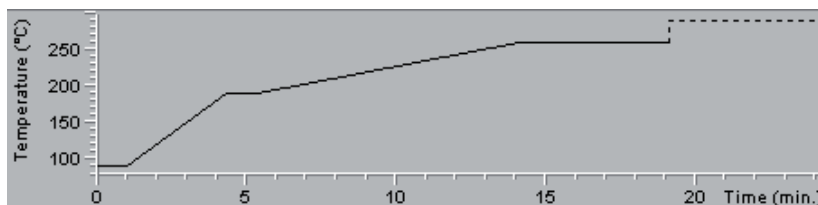
Las disoluciones de trabajo se realizaron a partir de las disoluciones madre o de las ampollas comerciales diluyéndolas en metanol. Se realizaron disoluciones separadas de los compuestos sin deuterar a distintas concentraciones, que serían utilizadas para la elaboración de las rectas de calibrado, y por otro lado de los deuterados, que serían utilizados como patrones internos (PI).

Las disoluciones de trabajo han sido preparadas a 1, 4, 12 y 20 µg/mL. La disolución de los PI fue una mezcla de COC-d<sub>3</sub>, BE-d<sub>3</sub>, COD-d<sub>3</sub>, MOR-d<sub>3</sub> y 6-MAM-d<sub>3</sub> a 10 µg/mL.

#### **7.1.5 CONDICIONES DEL CROMATÓGRAFO DE GASES**

La separación cromatográfica ha sido realizada, tal como se ha indicado antes, empleando una columna capilar HP-5 (30 m x 250 µm x 0,25 µm). Como gas portador se ha utilizado helio, con un flujo de 1,0 mL/min. La temperatura del inyector ha sido de 240°C, con un tiempo de purga de 2 minutos. Las inyecciones se han efectuado manualmente en modo *splitless*. El volumen de inyección empleado fue de 1 µL. La temperatura de la columna se ha programado inicialmente a 90°C durante 1 minuto. La primera rampa ha sido de 30°C/min hasta llegar a los 190°C, donde se mantuvo 1 minuto. A continuación una segunda rampa de 8°C/min hasta 260°C, manteniéndose 5

minutos. El análisis se ha realizado en un tiempo total de 19 min. Finalizado éste, la columna se mantuvo a una temperatura de 290°C durante 5 minutos para favorecer su limpieza (Figura 7.1).



**Figura 7.1.** Programa de temperaturas.

### **7.1.6 CONDICIONES DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS**

Las temperaturas de la fuente de ionización, el analizador cuadrupolar y el detector han sido, respectivamente, 250°C, 100°C y 300°C, provocando la ionización de las moléculas mediante impacto electrónico con una energía de 70 eV. El rango de masas elegido fue 50-550, con una velocidad de barrido de 1,5 scans/s y un tiempo de parada en cada masa (*dwel time*) de 0,1 s.

Con el fin de averiguar las características espectrales de las moléculas de interés, se llevó a cabo una inyección en modo SCAN de soluciones (metanólicas o en acetonitrilo) de cada uno de los compuestos (previamente derivatizados, excepto la COC). El análisis cuantitativo se realizó en la modalidad SIM.

### **7.1.7 RECOGIDA Y RECEPCIÓN DE LAS MUESTRAS**

Muestras blanco de pelo, necesarias para la realización de la validación del método analítico, han sido obtenidas de 10 voluntarios (6 hombres y 4 mujeres) que declararon no haber nunca consumido drogas de abuso (confirmado previamente mediante RIA utilizando una metodología previamente estandarizada en nuestro laboratorio<sup>2</sup>). La aplicabilidad del método ha sido realizada en muestras de pelo remitidas al Servicio de Toxicología del Instituto Universitario de Medicina Legal (IUML) de Santiago de Compostela, procedentes de personas a tratamiento de desintoxicación y/o de personas puestas a disposición judicial. De todas las muestras remitidas al laboratorio se han

seleccionado un total de 20 pertenecientes a 15 hombres y 5 mujeres de entre 20 y 40 años de edad, cuyo *screening* previo mediante RIA había sido positivo a BE y/o MOR.

Todas las muestras de pelo con las que se ha trabajado correspondían a muestras de cabello, recogidas de la zona occipital, a ras del cuero cabelludo e identificando claramente los extremos proximal y distal. En los casos en los que la longitud del cabello era considerable ( $> 10$  cm), éste se ha dividido en secciones de 2 cm de largo (correspondientes al crecimiento de 2 meses), sin embargo, solamente se ha realizado el análisis de la sección de pelo próximo al cuero cabelludo, con el fin de determinar el uso de drogas durante los últimos dos meses.

Una vez en el laboratorio todas las muestras han sido adecuadamente identificadas y almacenadas a temperatura ambiente hasta su análisis.

## **7.1.8 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

### **7.1.8.1 PREPARACIÓN**

Las muestras de pelo han requerido una preparación previa consistente en una etapa inicial de lavado con una solución de Tween® 80 al 0,1% durante 10 minutos, que se ha repetido dos veces, seguida de otra etapa de lavado con 5 mL de agua Milli-Q, que también se ha repetido dos veces, para asegurar que la muestra estuviese libre de suciedad y eliminar la posible contaminación externa. A continuación las muestras han sido secadas en una estufa a 40°C durante 24h y posteriormente se ha procedido a cortar éstas con unas tijeras en trozos de longitud inferior a 1 mm. Por último se ha realizado su pesada en alícuotas de 50 mg, reservando los posibles duplicados con el fin de poder realizar un re-análisis, en caso necesario.

### **7.1.8.2 HIDRÓLISIS**

Las muestras de pelo pesadas en alícuotas de 50 mg fueron sometidas a una degradación enzimática para proceder al aislamiento de los analitos de la matriz queratínica en la cual están atrapados. Para esto se han añadido 500 µl de DTT 12 mg/mL a cada una de las muestras y la mezcla resultante se ha introducido en una estufa a 37°C durante dos horas. Pasado este tiempo se han añadido 500 µl de Pronasa

2 mg/mL a dicha mezcla y se ha introducido ésta de nuevo en la estufa a la misma temperatura durante por lo menos 12 horas.

Actualmente se ha conseguido reducir el tiempo necesario para realizar la hidrólisis enzimática del pelo utilizando la energía de ultrasonidos, sin embargo, en el momento de la realización de este trabajo aún no se había demostrado la aplicabilidad de esta energía para ayudar a la Pronasa E en la hidrólisis enzimática del pelo. Los resultados de este trabajo<sup>3</sup>, llevado a cabo en nuestro laboratorio, muestran que la hidrólisis enzimática puede ser completada en 30 min utilizando la energía de ultrasonidos. Este tiempo es bastante más corto que los tiempos empleados en los procedimientos de hidrólisis convencionales, comúnmente 12-24 h. Variables inherentes a la actividad enzimática, tales como el pH y la fuerza iónica, han resultado ser las más importantes, lo que significa que la liberación de los analitos se puede atribuir a la acción enzimática. El método acelerado optimizado conduce a la recuperación cuantitativa de todas las drogas investigadas y las concentraciones obtenidas son estadísticamente similares a las obtenidas después de la hidrólisis con Pronasa E con el método tradicional. Por lo tanto, en la evaluación de drogas de abuso en el pelo, el uso de la energía de ultrasonidos para acelerar la hidrólisis enzimática es una tendencia prometedora que debe ser plenamente explotada en el campo forense. Por este motivo, actualmente en nuestro laboratorio se usa como método de rutina para la hidrólisis de las muestras de pelo llegadas al laboratorio.

### **7.1.8.3 PROCESO DE EXTRACCIÓN**

La extracción de COC, BE, COD, MOR y 6-MAM de las muestras de pelo fue realizada mediante un proceso de SPE utilizando cartuchos Waters Oasis<sup>®</sup> HLB 3cc (60 mg). Estos cartuchos están rellenos por un copolímero macroporoso, poli-(divinilbenceno-co-N-vinilpirrolidona), con balance hidrofílico-lipofílico. Se trata de rellenos apolares que permiten la retención de los analitos en su forma no ionizada.

A 900 µL del líquido de hidrólisis del pelo se le añadieron 20 µL de una mezcla de los PI (COC-d<sub>3</sub>, BE-d<sub>3</sub>, COD-d<sub>3</sub>, MOR-d<sub>3</sub> y 6-MAM-d<sub>3</sub> a 10 µg/mL) y dicha mezcla se diluyó a 1 mL con agua Milli-Q. Posteriormente se acondicionó a pH básico añadiendo 1 mL de tampón borato (pH 9). Este acondicionamiento de las muestras a pH básico permite que

las drogas se encuentren principalmente en su forma no ionizada, favoreciendo así la retención de las mismas en el relleno de las columnas de extracción.

Las columnas fueron acondicionadas con 2 mL de metanol seguido de 2 mL de agua Milli-Q. El primer lavado fue realizado con 2 mL de una mezcla de agua:metanol (95:5, v/v) y el segundo con 2 mL de una mezcla de agua:metanol:NH<sub>4</sub>OH (80:18:2, v/v/v). Los cartuchos fueron secados durante 20 minutos, con ayuda de una bomba de vacío, antes de realizar la elución de los analitos con 2 mL de una mezcla de metanol:ácido acético (98:2, v/v).

#### **7.1.8.4 DERIVATIZACIÓN**

Los extractos fueron evaporados a seco a 40°C bajo una suave corriente de nitrógeno y el extracto seco fue derivatizado con 40 µL BSTFA-TMCS (99:1, v/v) a 100°C durante 20 min. Después de enfriar la muestra a temperatura ambiente, 1 µL de ésta fue inyectada manualmente en el sistema cromatográfico.

#### **7.1.9 VALIDACIÓN DEL MÉTODO**

La validación de un método analítico incluye todos los procedimientos necesarios para demostrar que el procedimiento analítico destinado a la determinación cuantitativa de un analito (o una serie de analitos) en una matriz biológica particular es fiable para la aplicación buscada<sup>4</sup>.

La fiabilidad de los hallazgos analíticos es de gran importancia en Toxicología Forense y Clínica, siendo un prerrequisito para realizar una correcta interpretación toxicológica de los mismos, puesto que en los casos judiciales las consecuencias jurídicas dependerán de los valores detectados, y en los casos clínicos, los valores encontrados condicionarán el tratamiento del paciente<sup>5</sup>. Actualmente, cualquier estudio realizado basándose en un método no validado correctamente carece de valor científico<sup>6</sup>.

Los ensayos necesarios para validar correctamente un método bioanalítico así como la terminología que debe ser utilizada han sido motivo de discusión desde los años noventa. Organismos como la estadounidense FDA (*Food and Drug Administration*)<sup>7</sup> y la internacional ICH (*International Conference Harmonisation*)<sup>8,9</sup> han establecido

definiciones de los términos utilizados así como los aspectos metodológicos y prácticos. Una completa revisión de los parámetros de validación ha sido realizada por Shah y cols.<sup>10</sup> y por Peters y Maurer<sup>5</sup>. Los criterios recomendados en estas revisiones así como los establecidos por los organismos estadounidenses e internacionales han sido utilizados en la validación de los métodos desarrollados en esta Tesis.

Los parámetros estudiados han sido: la selectividad, el modelo de calibración (linealidad), los límites (límite de detección, límite inferior de cuantificación y límite superior de cuantificación), la precisión intradía e interdía, la exactitud intradía e interdía y el rendimiento.

### **7.1.9.1 SELECTIVIDAD**

Los términos selectividad y especificidad se suelen emplear a menudo indistintamente. La especificidad es la capacidad de evaluar inequívocamente el analito en presencia de compuestos endógenos de la matriz (metabolitos y productos de descomposición). La selectividad incluye la capacidad de separar el analito tanto de compuestos endógenos como exógenos (medicamentos co-administrados y otros xenobióticos).

Existen diferentes métodos para validar la selectividad. Karnes y cols.<sup>11</sup> consideran que el método más sencillo, cuando se trata de análisis cromatográficos, es demostrar la ausencia de respuesta en una muestra blanco de la matriz biológica en estudio. Para confirmar que el método analítico es selectivo se debe realizar el análisis de por lo menos seis muestras blanco de diferente procedencia<sup>7</sup> y si el método se desea para cuantificar más de un analito debe comprobarse la selectividad para cada uno de los analitos. Para esto se analizan los cromatogramas a lo largo de las ventanas de detección que comprendan los tiempos de retención de los analitos de interés, asegurándose de que no hay interferencias en ningún caso.

En este trabajo, la evaluación de la selectividad se realizó analizando el pelo de diez sujetos que no habían consumido las sustancias estudiadas (muestras blanco).

### **7.1.9.2 MODELO DE CALIBRACIÓN (LINEALIDAD)**

La relación entre la concentración del analito en la muestra y la respuesta dada por el detector viene definida por la curva de calibración. La curva de calibración debe ser elaborada en la misma matriz que la muestra a cuantificar y el rango de concentraciones debe incluir a la concentración estudiada.

Normalmente la relación concentración/respuesta sigue un modelo lineal. Otros modelos posibles son, por ejemplo, el cuadrático y el cúbico, aunque son más complejos y menos robustos.

En un modelo lineal la recta de calibrado ( $y = A + Bx$ , donde A es el punto de corte en el eje de coordenadas y B la pendiente de la recta) ha de ser elaborada con 5-8 niveles de concentración distintos. En los modelos no lineales (cuadrático, cúbico) es necesario realizar un mayor número de niveles.

El modelo estadístico elegido normalmente para calcular la regresión lineal es el modelo de los mínimos cuadrados. Este modelo es aplicable a datos homocedásticos, es decir, que la varianza a lo largo del rango de calibración sea constante. En el caso de datos heterocedásticos (varianza variable a lo largo del rango), éstos deben ser matemáticamente transformados o ponderados para poder aplicar el modelo de los mínimos cuadrados. Las ponderaciones más habituales son  $1/x$  y  $1/x^2$ . El modelo de calibración elegido ha sido el de mínimos cuadrados, esta elección ha sido realizada en base a un examen visual de la curva de calibrado y un estudio de las residuales obtenidas aplicando el modelo. Las residuales se expresan normalmente en porcentaje y se definen como la diferencia existente entre nuestro valor y el predicho por el modelo. Si el modelo es adecuado han de ser inferiores a un  $\pm 15 \%$ , excepto en el caso del límite inferior de cuantificación que se admiten valores inferiores a  $\pm 20 \%$ .

Un parámetro que nos indica la calidad del ajuste de los puntos a una recta es el coeficiente de regresión ( $r^2$ ), cuyos valores oscilan entre 0 (no ajuste) y 1 (ajuste total), de tal modo que cuánto más se acerque a 1 dicho parámetro, más se aproximará la distribución de los puntos a una recta.

El estudio de la linealidad ha sido realizado preparando controles de calibrado con muestras blanco de pelo con concentraciones de 0,5; 1; 2; 4; 12 y 20 ng/mg (Tabla 7.1), las cuales fueron sometidas al proceso de tratamiento de muestra previamente descrito. Para cada concentración, seis controles de calibrado han sido preparados en días diferentes.

**Tabla 7.1.** Preparación de los controles de calibrado.

	0,5 ng/mg	1 ng/mg	2 ng/mg	4 ng/mg	12 ng/mg	20 ng/mg
SOL. 1 µg/ml	25 µl	50 µl	-	-	-	-
SOL. 4 µg/ml	-	-	25 µl	50 µl	-	-
SOL. 12 µg/ml	-	-	-	-	50 µl	-
SOL. 20 µg/ml	-	-	-	-	-	50 µl
PI 10 µg/ml	-	-	-	20 µl	-	-

### 7.1.9.3 LÍMITES

El límite de detección (LOD, *Limit Of Detection*) de un método analítico se define como la mínima cantidad de analito que presenta una relación señal/ruido mayor de 3.

El límite inferior de cuantificación (LLOQ, *Lower Limit Of Quantitation*) se define como la menor cantidad de analito que presenta una relación señal/ruido mayor de 5 y que puede ser medida con una imprecisión y una inexactitud menor del 20%. Normalmente su valor coincide con el nivel más bajo de la recta de calibrado.

El límite superior de cuantificación (ULOQ *Upper Limit Of Quantitation*) se define como la máxima cantidad de analito que puede ser medida con una imprecisión y una inexactitud menor del 15%. Normalmente su valor coincide con el nivel más alto de la recta de calibrado.

El cálculo de estos parámetros ha sido realizado empíricamente analizando 5 replicados de muestras blanco de pelo con concentraciones decrecientes de los analitos de interés.



#### 7.1.9.4 PRECISIÓN

Según la ICH<sup>8,9</sup>, la precisión de un método analítico es la proximidad entre los valores obtenidos en una serie de medidas de muestras procedentes de la misma madre y analizadas bajo las mismas condiciones. La precisión fue estudiada a dos niveles:

- Precisión intradía o repetibilidad: es la precisión del método entre varias muestras obtenidas en el mismo proceso analítico.
- Precisión interdía o reproducibilidad: es la precisión del método dentro del laboratorio variando el día del análisis, el analista, etc.

En el cálculo de la precisión se analizaron 5 replicados de una concentración el mismo día de análisis (precisión intradía) o en días distintos (precisión interdía). Se ha estudiado la precisión a tres niveles de concentración diferentes (LLOQ, ULOQ y un punto intermedio de la recta de calibración).

La precisión suele medirse en términos de imprecisión, expresada como coeficiente de variación (CV). El CV de los replicados deber ser menor de un 15%. En el caso de que el nivel estudiado sea el LLOQ se admite que el CV sea menor de un 20%.

El CV, también conocido como desviación estándar relativa (RSD, *Relative Standard Deviation*), viene determinado por la fórmula:

$$CV = RSD = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

**Ecuación 7.1.** Coeficiente de variación.

donde **s** (desviación estándar) se calcula:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

**Ecuación 7.2.** Desviación estándar.

Siendo  $\bar{x}$  el valor de la media,  $x_i$  cada una de las medidas individuales y  $n$  el número total de medidas realizadas.

#### 7.1.9.5 EXACTITUD

La exactitud de un método analítico nos indica en qué medida los valores medidos se diferencian del valor de referencia (valor verdadero o teórico). Al igual que la precisión, la exactitud puede ser medida a dos niveles, es decir, la exactitud intradía y la exactitud interdía.

En el cálculo de la exactitud se analizaron 5 replicados de una concentración el mismo día de análisis (exactitud intradía) o en días distintos (exactitud interdía) para tres niveles de concentración (LLOQ, ULOQ y un punto intermedio de la recta de calibración).

La exactitud suele medirse en términos de inexactitud. La medida matemática que lo expresa es el denominado error medio relativo (MRE, *Mean Relative Error*) que viene dado por la fórmula:

$$\text{MRE} = \frac{\text{media concentraciones medidas} - \text{valor teórico}}{\text{valor teórico}} \cdot 100$$

**Ecuación 7.3.** Error medio relativo.

El MRE debe ser menor de un 15%, excepto en el caso de que el nivel estudiado sea el LLOQ, donde se admite que el error medio relativo sea menor de un 20%.

#### 7.1.9.6 RENDIMIENTO

El rendimiento o recuperación de un procedimiento analítico mide la eficacia del proceso de extracción. Se calcula comparando la señal de replicados de la muestra blanco a los que se añadió una determinada cantidad de analito y de PI antes de la extracción, con la señal dada por otros replicados de muestra blanco con PI a los que se les añadió esa misma cantidad de analito después de realizar la extracción. Estas últimas muestras serían las correspondientes a un hipotético rendimiento del 100%.

El porcentaje de rendimiento se calcularía como:

$$\text{Rendimiento} = \frac{A}{P} \cdot 100$$

**Ecuación 7.4.** Rendimiento.

Siendo **A** la media de los valores medidos de los replicados de muestra a los que se les añadió antes de la extracción una determinada cantidad del analito y **P** la media de los valores medidos de los replicados de muestra a los que se les añadió posteriormente la misma cantidad del analito.

En el cálculo del rendimiento se utilizaron 5 replicados para dos niveles de concentración (punto bajo y alto de la recta de calibración). Se consideraron adecuados valores de rendimiento de extracción superiores a un 40%.

#### **7.1.10 APLICACIÓN A CASOS REALES**

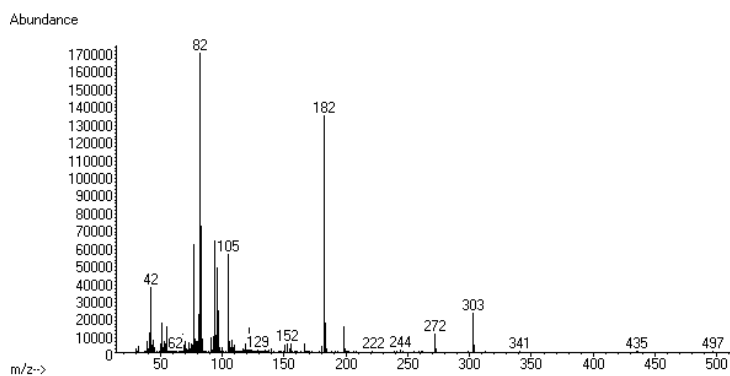
El método desarrollado ha sido aplicado a 20 casos reales recibidos en el Servicio de Toxicología del IUML de Santiago procedentes de consumidores de COC y/o HER.

La cuantificación de estas muestras se realizó con rectas de calibrado extraídas e inyectadas el mismo día que las muestras correspondientes. En el caso de muestras a concentraciones superiores al ULOQ, éstas fueron diluidas convenientemente y nuevamente analizadas.

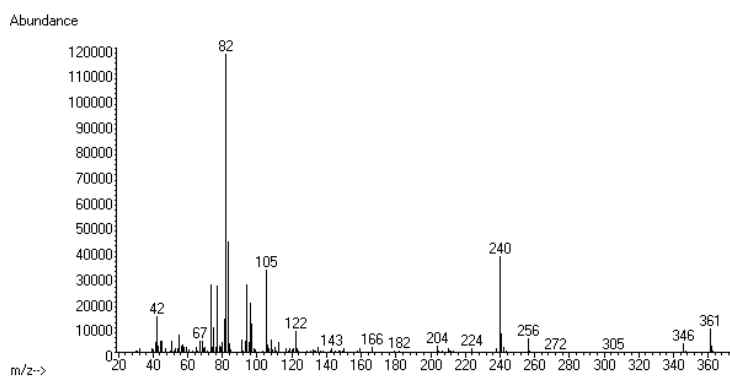
## **7.2 RESULTADOS**

### **7.2.1 CONDICIONES DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS**

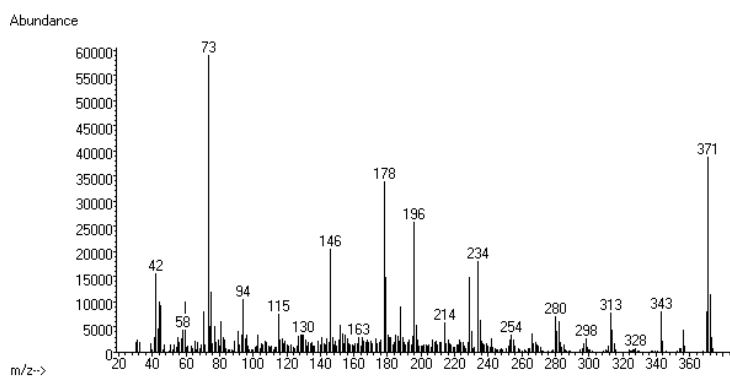
Las figuras 7.2.-7.11 muestran los espectros de masas de cada una de las moléculas estudiadas y sus análogos deuterados. Tal y como se ha comentado en el Apartado 7.1.6, dichos espectros fueron obtenidos tras la inyección de cada una de las moléculas por separado. La adquisición de datos se hizo en modo SCAN en el rango masas de 50 a 550.



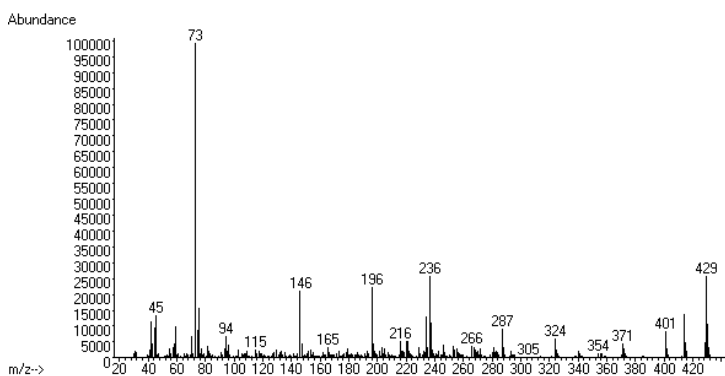
**Figura 7.2.** Espectro de masas de la COC.



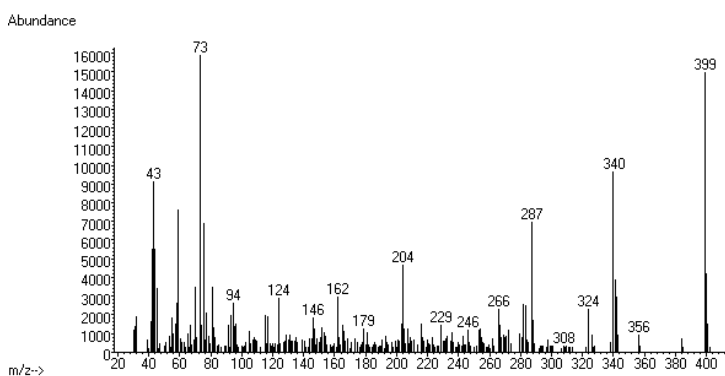
**Figura 7.3.** Espectro de masas de la BE-TMS.



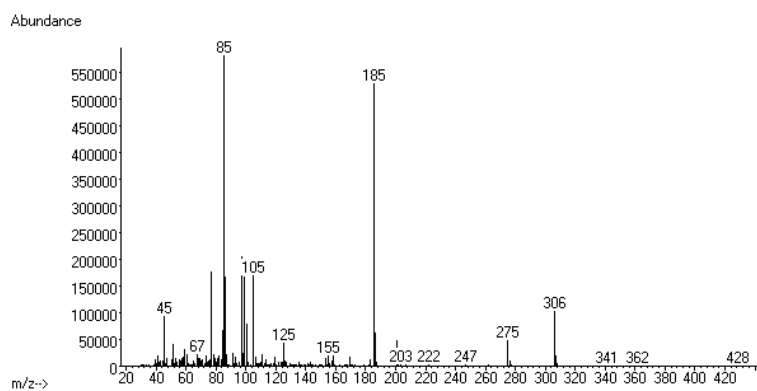
**Figura 7.4.** Espectro de masas de la COD-TMS.



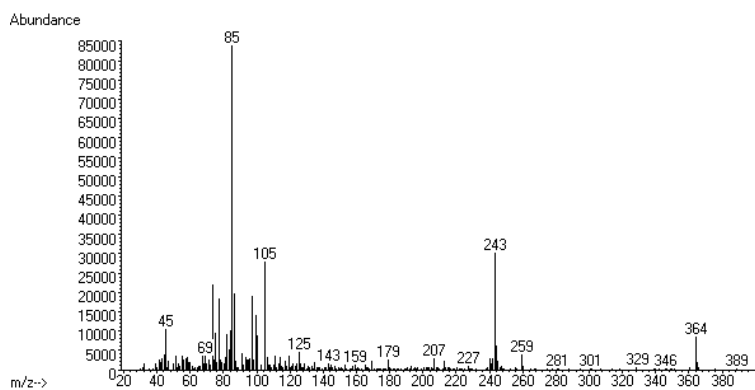
**Figura 7.5.** Espectro de masas de la MOR-2TMS.



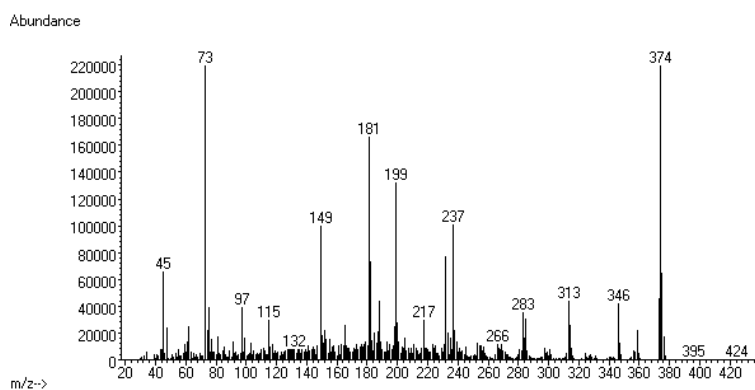
**Figura 7.6.** Espectro de masas de la 6-MAM-TMS.



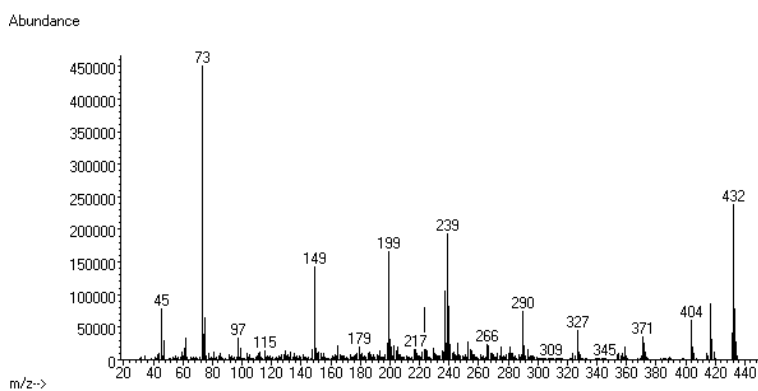
**Figura 7.7.** Espectro de masas de la COC-d<sub>3</sub>.



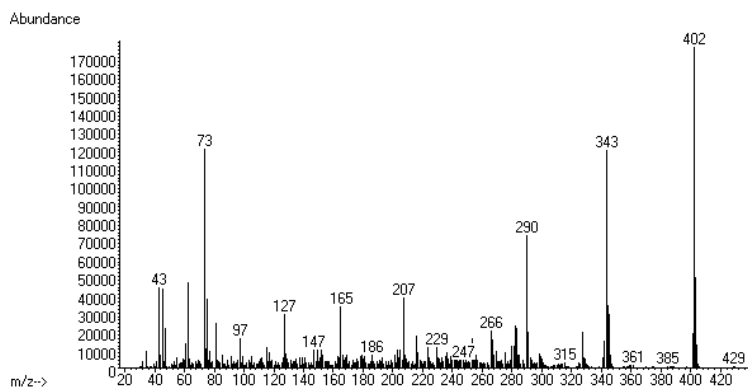
**Figura 7.8.** Espectro de masas de la BE-TMS-d<sub>3</sub>.



**Figura 7.9.** Espectro de masas de la COD-TMS-d<sub>3</sub>.



**Figura 7.10.** Espectro de masas de la MOR-2TMS-d<sub>3</sub>.



**Figura 7.11.** Espectro de masas de la 6-MAM-TMS- $d_3$ .

A partir de los espectros obtenidos se realizó la elección de iones seleccionando como cuantificadores y cualificadores los iones de mayor abundancia. Posteriormente, entre éstos se eligieron los de mayor abundancia como iones cuantificadores para cada analito y cada PI (un ión cuantificador en cada caso) dejando el resto de los iones seleccionados como cualificadores. Este criterio de selección se debe a que los iones de mayor abundancia son los que proporcionan una mayor sensibilidad en el detector. Sin embargo, no en todos los casos el ión escogido como cuantificador para los compuestos estudiados así como para sus análogos deuterados lo constituyó el ión mayoritario ya que este ión no era característico del compuesto sino que era común a más de un compuesto. Además también hay que tener en cuenta otro factor importante, la disposición de los deuterios en el PI elegido, ya que los fragmentos obtenidos de la molécula deuterada deben ser distintos de los fragmentos obtenidos de la molécula sin deutar para evitar interferencias a nivel del ión de confirmación. Por este motivo, en el caso de que alguno de los iones mayoritarios de un compuesto fuese común con los del mismo compuesto deuterado, éstos fueron igualmente descartados (por ejemplo los iones 105 tanto de la COC como de la BE que también estaban presentes en sus respectivos derivados deuterados).

El método de masas se dividió en distintas ventanas de detección en las cuales el detector monitoriza en función del tiempo del cromatograma en el que se encuentre, distintas  $m/z$  de una misma molécula. Estas ventanas de detección han sido establecidas de acuerdo con el tiempo de retención presentado por dicha molécula.

En la siguiente tabla se recogen la selección de iones para los compuestos estudiados así como sus tiempos de retención y sus ventanas de detección.

**Tabla 7.2.** Selección de iones monitorizados para cada uno de los compuestos con sus ventanas de detección y sus respectivos tiempos de retención.

Compuesto	Ventana de detección (min)	m/z seleccionadas*	tr (min)
COC	11,6-13,0	<b>182</b> , 198, 303	12,5
COC-d <sub>3</sub>		<b>185</b> , 201, 306	
BE-TMS	13,0-14,5	<b>82</b> , 240, 361	13,2
BE-TMS-d <sub>3</sub>		<b>85</b> , 243, 364	
COD-TMS	14,5-15,5	178, 234, <b>371</b>	15,1
COD-TMS-d <sub>3</sub>		181, 237, <b>374</b>	
MOR-2TMS	15,5-16,1	236, 414, <b>429</b>	15,7
MOR-2TMS-d <sub>3</sub>		239, 417, <b>432</b>	
6-MAM-TMS	16,1-17,3	287, 340, <b>399</b>	16,6
6-MAM-TMS-d <sub>3</sub>		290, 343, <b>402</b>	

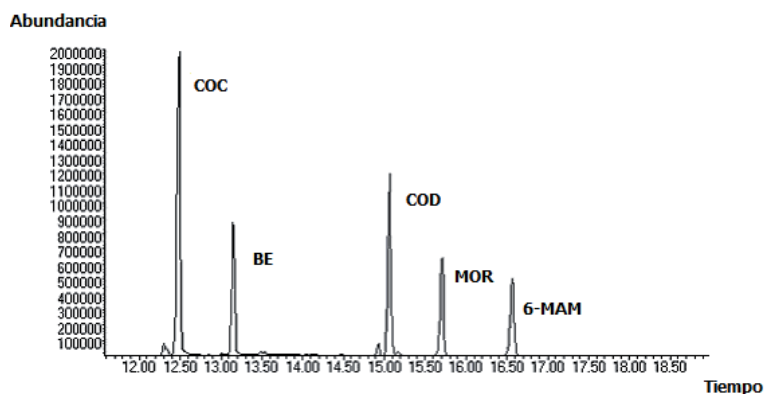
\*El ión de cuantificación figura en negrita.

## 7.2.2 SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

La separación cromatográfica fue realizada en las condiciones descritas en el apartado correspondiente de Material y Métodos. A través del programa cromatográfico empleado la separación de los compuestos se logró en menos de 17 minutos.

En la Figura 7.12 se muestra el cromatograma obtenido en modo SCAN de una muestra blanco de pelo preparada a 20 ng/mg. Como se puede observar, ninguno de los compuestos estudiados se solapa en el tiempo, por lo tanto la separación es completa (Resolución > 1).



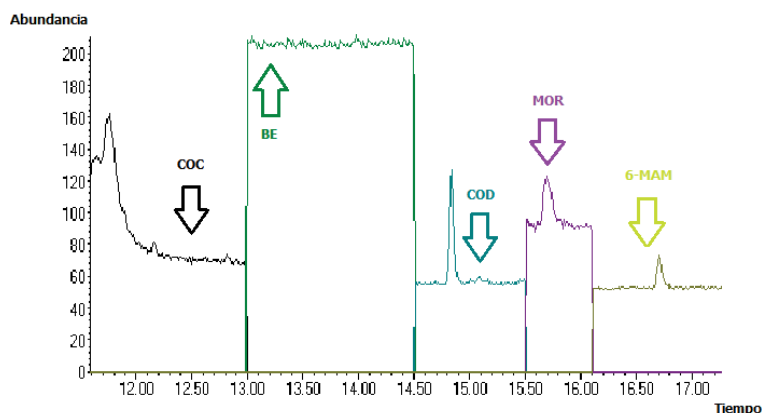


**Figura 7.12.** Cromatograma en modo SCAN de una muestra blanco de pelo preparada a 20 ng/mg.

## 7.2.3 RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN

### 7.2.3.1 SELECTIVIDAD

En las diez muestras blanco de pelo analizadas se comprobó que no existían interferencias con los analitos de interés, tanto para el ión de cuantificación como para los iones de confirmación. La Figura 7.13 muestra el cromatograma en modo SIM de los iones de cuantificación de los compuestos analizados en una de las muestras blanco de pelo.



**Figura 7.13.** Cromatograma en modo SIM de los iones de cuantificación de los compuestos analizados en una muestra blanco de pelo.

### **7.2.3.2 LINEALIDAD, LÍMITES, PRECISIÓN, EXACTITUD Y RENDIMIENTO**

La linealidad de la relación de áreas compuesto/PI frente a la concentración teórica fue verificada en el método propuesto usando el modelo de mínimos cuadrados. Los coeficientes de regresión ( $r^2$ ) fueron superiores a 0,99 en todos los casos.

El LOD observado para la COC, BE y MOR fue de 0,04 ng/mg, para la COD 0,02 ng/mg y para la 6-MAM 0,05 ng/mg. El LLOQ y el ULOQ, que se corresponden respectivamente con el valor inferior y superior de la recta de calibrado, fueron 0,5 y 20 ng/mg para todos los compuestos.

La precisión (intradía e interdía) expresada como CV y la exactitud (intradía e interdía) expresada como MRE, estudiadas ambas para el LLOQ (0,5 n/mg), el ULOQ (20 ng/mg) y para un punto intermedio de la recta de calibrado (2 ng/mg), fueron menores del 15%, o del 20% en el caso del LLOQ, para todos los compuestos estudiados.

El rendimiento del proceso de extracción calculado a dos valores de concentración intermedios (2 y 12 ng/mg) fue en todos los casos superior al 40%, variando éste entre el 66,75 y 96,67%.

Los parámetros de validación obtenidos para cada uno de los compuestos han sido recogidos en la siguiente tabla.

**Tabla 7.3.** Principales parámetros de validación del método.

	Conc ng/mg	LOD ng/mg	LOQ ng/mg		Precisión y exactitud intradía (%)		Precisión y exactitud interdía (%)		R (%)	
			LLOQ	ULOQ	CV	MRE	CV	MRE		
COC	0,5	0,04	0,5	20	9,61	3,864	13,67	8,772	89,24	
	2				1,705	4,858	9,203	0,041		
	12									95,28
	20				3,923	0,659	1,955	0,367		
Curva de calibración (n=6): A=0, B=0,270±0,045, r²=0,995±0,003										
BE	0,5	0,04	0,5	20	5,954	15,55	9,004	2,701	89,91	
	2				2,858	2,501	2,964	4,303		
	12									96,67
	20				0,238	0,619	1,495	0,204		
Curva de calibración (n=6): A=0, B=0,177±0,048, r²=0,994±0,003										
COD	0,5	0,02	0,5	20	11,25	12,43	17,89	13,93	76,63	
	2				2,114	0,678	7,369	2,208		
	12									68,02
	20				4,065	2,895	2,777	0,179		
Curva de calibración (n=6): A=0, B=0,269±0,041, r²=0,995±0,004										
MOR	0,5	0,04	0,5	20	11,91	18,24	6,136	10,04	81,34	
	2				1,335	5,592	1,801	2,119		
	12									66,75
	20				0,207	0,701	0,664	0,025		
Curva de calibración (n=6): A=0, B=0,249±0,051, r²=0,997±0,003										
6-MAM	0,5	0,05	0,5	20	7,345	4,442	12,19	9,907	89,21	
	2				6,243	4,315	7,468	6,823		
	12									88,18
	20				1,805	2,703	1,919	0,464		
Curva de calibración (n=6): A=0, B=0,1700±0,031, r²=0,995±0,005										

## 7.2.4 APLICACIÓN A CASOS REALES

Los resultados de GC-MS obtenidos para las 20 muestras de pelo analizadas se muestran en la Tabla 7.4.

**Tabla 7.4.** Resultados GC-MS de las 20 muestras de pelo analizadas.

Muestra	Concentración (ng/mg)				
	COC	BE	COD	MOR	6-MAM
1	3,33	2,20	-	-	-
2	4,06	2,49	-	-	-
3	2,73	2,87	-	-	-
4	3,90	2,28	-	-	-
5	3,66	2,36	-	-	-
6	3,93	2,33	-	-	-
7	2,38	2,03	-	-	-
8	0,71	0,55	0,51	1,54	2,09
9	1,65	0,80	0,51	1,29	4,41
10	1,85	1,11	0,29	0,61	4,14
11	2,08	2,42	-	-	-
12	1,80	2,30	-	-	-
13	1,56	2,22	-	-	-
14	0,41	0,28	-	-	-
15	0,10	0,19	-	-	-
16	1,71	0,79	-	1,77	0,23
17	10,5	5,09	2,29	6,93	4,42
18	20,3	18,3	2,49	8,75	43,2
19	39,7	55,7	3,80	20,2	95,4
20	93,8	6,78	5,11	31,1	158

De las 20 muestras analizadas, la COC y la BE en solitario han sido detectadas en 12 casos (60%) y asociadas a los opioides de estudio en 8 casos (40%).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. López P, Bermejo AM, Tabernero MJ, Fernández P, Álvarez I. Determination of cocaine and heroin with their respective metabolites in human hair by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Letters* 39(11) (2006) 2307-2316.
2. Tabernero MJ, Bermejo AM, Fernández P. Analysis of opiates and cocaine by RIA and GC-MS: distribution of their metabolites in urine and hair from drug addicts. *Addict Biol* 4(4) (1999) 421-428.
3. Framil M, Pinero A, Bermejo P, López P, Tabernero MJ, Bermejo AM. Improvements on enzymatic hydrolysis of human hair for illicit drugs determination by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Chem* 79(22) (2007) 8564-8570.
4. Shah VP, Midha KK, Findlay JWA, Hill HM, Hulse JD, McGilveray IJ, McKay G, Millar KJ, Patnaik RN, Powell ML, Tonelli A, Viswanathan CT, Yacobi A. Bioanalytical method validation – A revisit with a decade of progress. *Pharm Res* 17(12) (2000) 1551-1557.
5. Peters FT, Maurer HH. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology – A review. *Accred Qual Assur* 7(11) (2002) 441-449.
6. Hartmann C, Smeyers-Verbeke J, Massart DL, McDowall RD. Validation of bioanalytical chromatographic methods. *J Pharm Biomed Anal* 17(2) (1998) 193-218.
7. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research (2001) Guidance for industry: Bioanalytical method validation, Rockville, MD.  
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>. Accessed 23 Mar 2010.
8. International Conference on Harmonization (ICH) (1994) Validation of analytical methods: Definitions and terminology ICH Q2A.
9. International Conference on Harmonization (ICH) (1996) Validation of analytical methods: Definitions and terminology ICH Q2B
10. Shah VP, Midha KK, Findlay JWA, Hill HM, Hulse JD, McGilveray IJ, McKay G, Millar KJ, Patnaik RN, Powell ML, Tonelli A, Viswanathan CT, Yacobi A. Bioanalytical method validation - A revisit with a decade of progress. *Pharm Res* 17(12) (2000) 1551-1557.

11. Karnes HT, Shiu G, Shah VP. Validation of bioanalytical methods. Pharm Res 8(4) (1991) 421-426.

# Anexos





## FORENSIC ANALYSIS

# Determination of Cocaine and Heroin with Their Respective Metabolites in Human Hair using Gas Chromatography-Mass Spectrometry

P. López, A. M. Bermejo, M. J. Tabernero, P. Fernández,  
and I. Álvarez

Institute of Legal Medicine, Forensic Toxicology Service, Faculty of  
Medicine, University of Santiago de Compostela, San Francisco,  
Santiago de Compostela, Spain

**Abstract:** This paper describes a gas chromatography-mass spectrometry method for the simultaneous detection of opiates, cocaine, and benzoylecgonine from human hair samples. Conditioning samples were extracted with Waters Oasis HLB (hydrophilic-lipophilic balance) cartridges. The detector response was linear for the drugs studied over the range 0.5–20 ng/mg. The limits of quantitation and detection were found to be acceptable. Intra- and interbatch coefficients of variation oscillated between 0.2 and 17.9%, and mean relative errors were in the range of 0.04–18.2%. The recoveries were higher than 66.7% in all cases. Finally, the method was applied to 20 hair samples from drug users, obtaining positive results in all cases.

**Keywords:** Cocaine, opiates, hair, solid phase extraction, gas chromatography-mass spectrometry

## 1. INTRODUCTION

Hair analysis has proven to be a reliable indicator of past drug abuse (Pepin and Gaillard 1997), as a complement to blood or urinalysis, for proving or excluding chronic drug use or, at least, exposure to drugs. Therefore, it

Received 19 January 2006; accepted 20 March 2006

Address correspondence to P. Fernández, Institute of Legal Medicine, Forensic Toxicology Service, Faculty of Medicine, University of Santiago de Compostela, San Francisco s/n. 15782, Santiago de Compostela, Spain. E-mail: imlpuri@usc.es

becomes highly useful in monitoring long-term histories of drug abuse (Tagliaro et al. 1997; Lewis et al. 1997; Sachs 1997).

As a biological matrix, hair offers particular advantages: it can be easily obtained without violating individual privacy, it is not easily adulterated, and, due to its stability, it can be stored and transported without requiring specific precautions. Moreover, hair analysis permits the assessment of early drug exposure, at the same time allowing a chronological profile of the consumption depending on the length (segments) of the hair to be obtained.

In order to differentiate passive contamination from active intake, an effective hair decontamination procedure and a correct quantitative determination of compounds are essential to know metabolite/compound ratios. For this reason, the extraction procedure from hair has to be performed with high recovery and without significant degradation of the drug.

Several papers describe analysis of opiates or cocaine in human hair with different procedures as well as methods for their simultaneous determination. Methods of analysis based on high-pressure liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) are reported (Romolo et al. 2003; Bogusz 2000; Maurer 1998). GC-MS in the electron impact mode is the most common procedure used.

This paper describes how we used GC-MS to determine cocaine, benzoylecgonine, codeine, morphine, and 6-acetylmorphine in hair.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Chemical Reagents and Standards

Methanol and acetonitrile from Merck (Darmstadt, Germany) were gradient-grade solvents. Cocaine (CO), benzoylecgonine (BE), codeine (CD), morphine (M), and 6-acetylmorphine (6AM) were purchased from Lipomed (Mundolsheim Cédex, France), and their respective deuterated-labeled analogs solutions, CO-d<sub>3</sub>, BE-d<sub>3</sub>, CD-d<sub>3</sub>, M-d<sub>3</sub>, and 6AM-d<sub>3</sub>, were purchased from Cerilliant (Round Rock, Texas). Pronase E, dithiotreitol (DTT), HCl, NaOH, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, KCl, CH<sub>3</sub>COOH, trimethylchlorosilane (TMCS), and N,O-bis-trimethylsilyl-trifluoroacetamide (BSTFA) were obtained from Merck. Trihydroxymethylaminomethane (TRIS) was purchased from Scharlau (Barcelona, Spain).

### 2.2. Preparation of Solutions

DTT and Pronase solutions were prepared at a concentration of 12 mg/mL and 2 mg/mL, respectively, in TRIS-HCl buffer, pH 7.2. The buffer was prepared by mixing 50 mL of 0.1M TRIS (12.1 g/L) with 44.7 mL of 0.1M HCl and making up to 100 mL with distilled water.

The borax buffer, pH 9.2, was prepared by mixing 6.2 g of  $\text{H}_3\text{BO}_3$  and 7.5 g of KCl with 420 mL of 0.1M NaOH and making up to 1 L with distilled water.

Working solutions at a concentration of 1 mg/mL were prepared with acetonitrile for cocaine and methanol for the rest in volumetric glassware. Stock solutions were stored at 4°C when they were not in use.

### 2.3. Hair Samples

Real hair samples were collected from 20 people ranging in age from 20 to 40 years (15 men and 5 women). For all, screening tests were positive for drug abuse. Drug-free control hair was taken from 10 volunteers (6 men and 4 women) that had never used drugs such as opiates or cocaine. The hairs were collected from the vertex posterior area as close as possible to the scalp, and the proximal and distal ends were carefully identified. Sectional analysis was performed with hair samples longer than 10 cm. The hair samples were divided into segments about 2 cm long, corresponding to 2-month growth.

### 2.4. Hair Analysis

#### 2.4.1. Sample Preparation

Hair samples were submitted to an initial procedure of decontamination by washing twice in 5 mL of a 0.1% solution of Tween 80 for 10 min, rising twice with 5 mL of distilled water to eliminate the external contamination, and the last wash analyzed to exclude external contamination. After drying, each sample was cut into 1-mm segments, then 50 mg of hair was weighted.

#### 2.4.2. Enzymatic Hydrolysis

Samples were digested at 37°C overnight with 1 mL of a solution of Pronase (2 mg/mL) and dithiotreitol (12 mg/mL) in Tris buffer (pH 7.2).

#### 2.4.3. Solid Phase Extraction

Twenty microliters of each internal standard, at a concentration of 10  $\mu\text{g/mL}$ , and 1000  $\mu\text{L}$  of the borax buffer (pH 9.2) were added to a 900- $\mu\text{L}$  volume of sample conditioning. Then, the samples were extracted with Waters Oasis HLB (hydrophilic-lipophilic balance) cartridges. The cartridge was conditioned with methanol (2 mL) followed by distilled water (2 mL). The sample was then passed slowly through the column. The cartridge was rinsed with a mixture (2 mL) of 5% methanol/distilled water, followed by a mixture (2 mL) of 20%  $\text{NH}_4\text{OH}$ /80% of 2% MeOH/distilled water and

allowed to dry for 20 min under vacuum. Analytes were eluted with a mixture (2 mL) of 2%  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{MeOH}$  that was evaporated to dryness under a gentle nitrogen stream.

#### 2.4.4. Derivatization

A 40- $\mu\text{L}$  volume of BSTFA-TMCS (99:1) was added to the dried extracts. The tubes were tightly closed, vortex mixed (10 sec), and heated at  $100^\circ\text{C}$  for 20 min. After cooling at room temperature, 1  $\mu\text{L}$  was injected into the gas chromatograph.

### 2.5. GC-MS Analysis

The analyses were carried out on a Hewlett-Packard gas chromatograph 6890 Series equipped with a mass selective detector Hewlett-Packard 5973 Inert. The column used was an HP-5 (30 m  $\times$  250  $\mu\text{m}$  i.d.), 5% phenylmethylsiloxane, and film thickness of 0.25  $\mu\text{m}$  purchased from Agilent Technologies (Milan, Italy). Helium was used as a carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. The injector was maintained at  $240^\circ\text{C}$  and operated for 2 min in splitless mode. The column temperature was initially programmed at  $90^\circ\text{C}$  (1 min), followed by a  $30^\circ\text{C}/\text{min}$  ramp to  $190^\circ\text{C}$  (1 min), then a second  $8^\circ\text{C}/\text{min}$  ramp to  $260^\circ\text{C}$  (5 min), and finally the temperature was kept at  $290^\circ\text{C}$  (5 min). The mass selective detector was kept at  $300^\circ\text{C}$ , the ion source at  $250^\circ\text{C}$ , and the quadrupole at  $100^\circ\text{C}$ . The mass analyzer operated by electron impact (70 eV) in selected ion monitoring (SIM) acquisition mode. Table 1 shows retention times and selected ions for the analytes of interest and their corresponding internal standards.

### 2.6. Validation Process

The following criteria were used to evaluate the method: sensitivity, linearity, intra- and interbatch precision, accuracy, and recovery.

The sensitivity of the method was evaluated by determining the limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ). LOD was defined as the concentration with a signal-to-noise (S/N) ratio of at least 3, while LOQ was the lowest standard with an S/N ratio of at least 10 and acceptable precision and accuracy. Both parameters were determined empirically by analysis of a series of decreasing concentrations of the drug-fortified plasma in five replicates.

Calibration, using internal standardization, was done by linear regression analysis over a maximum concentration range from 0.5–20 ng/mg. For each standard curve, six different concentrations were used, not including the blank

**Table 1.** Retention times and selected ions of the analytes and the corresponding internal standards

Compound	Retention time (min)	Selected m/z ratios <sup>a</sup>
Cocaine	12.5	<b>182</b> , 198, 303
Cocaine-d <sub>3</sub>	12.5	<b>185</b> , 201, 306
BE	13.2	<b>82</b> , 240, 361
BE-d <sub>3</sub>	13.2	<b>85</b> , 243, 364
Codeine	15.1	<b>371</b> , 178, 234
Codeine-d <sub>3</sub>	15.1	<b>374</b> , 181, 237
Morphine	15.7	<b>429</b> , 236, 414
Morphine-d <sub>5</sub>	15.7	<b>432</b> , 239, 417
6AM	16.6	<b>399</b> , 287, 340
6AM-d <sub>3</sub>	16.6	<b>402</b> , 290, 343

<sup>a</sup>Quantifying ions are in bold.

matrix. Regression line was calculated by the method of least squares and linearity was expressed by the correlation coefficient ( $R^2$ ).

Precision and accuracy were evaluated over the linear dynamic range (0.5–20 ng/mg), and the specific concentrations tested are given in Table 3. Intrabatch precision and accuracy was assessed with five determinations per concentration in one day, while interbatch precision and accuracy was evaluated by six determinations per concentration on different days. Precision (coefficient of variation) was calculated as: (standard deviation/mean)  $\times$  100, while accuracy was calculated as: (mean concentration quality control – nominal concentration)/(nominal concentration)  $\times$  100. The precision and accuracy must be less than 20% deviation at the lower limit of quantitation (LLOQ) and less than 15% deviation at higher concentration levels (FDA 2003).

Recovery or extraction efficiency (%) for each analyte was determined at low and high concentration levels. The efficiency was then calculated comparing the areas of peaks after extraction of hair samples spiked with the drugs, with those obtained after direct injection of the drugs at the same concentrations.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

It is well known that the stability of some analytes may be affected during the incubation step. For example, 6AM may be hydrolyzed at alkaline pH to morphine, while cocaine may be hydrolyzed to BE and ecgonine methyl ester. Consequently, alkaline hydrolysis can't be used. Investigated substances can only be extracted after hydrolysis by acid (Kintz and Mangin 1993) or by enzyme (Offidani et al. 1993). In the present work, enzymatic hydrolysis

was chosen because it gave extraction recoveries higher than acid hydrolysis with dirty extracts and chromatograms with an important interfering background.

The study was performed using Waters Oasis HLB cartridges. The material used in this kind of column is a copolymer designed to have an HLB that gives high and reproducible recoveries for acidic, basic, and neutral compounds, even if the cartridge runs dry. For this reason, the pH of the eluted samples through the cartridges is of utmost importance, and the recovery depends on the ionized or nonionized form of the analytes (Franke and Zeeuw 1998). Borax buffer at pH 9.2 was found to be an optimal medium, because it was effective for extracting the compounds of interest without degradation.

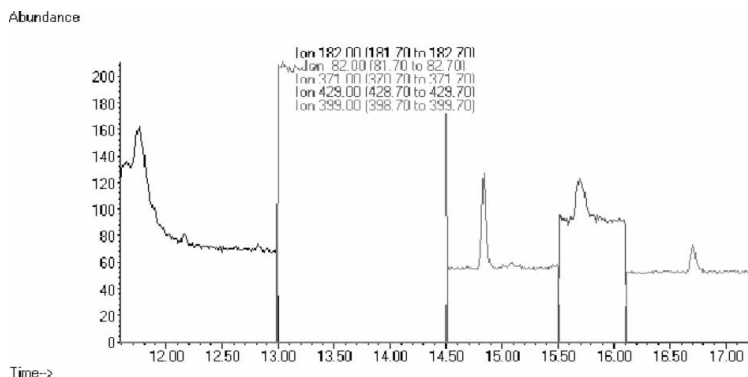
The completed method was validated according to the criteria described in the Experimental Section. The LODs, LOQs, and calibration results are detailed in Table 2. LOD was established between 0.02 and 0.05 ng/mg and LOQ was 0.5 ng/mg for all cases. Linearity was obtained with an average correlation coefficient higher than 0.99, over a dynamic range from the LOQ value up to 20 ng/mg for each analyte. The linear dynamic range of the method was clinically relevant to monitor drug use by hair analysis. Our results of sensitivity were better than those found by Skender et al. (2002) using Bond Elut Certify columns. The results of the coefficient of correlation are better than others obtained by Romolo et al. (2003) and similar to those obtained by Montagna et al. (2000), using both Bond Elut Certify cartridges.

Figures 1 and 2 show typical chromatograms obtained for a blank and a positive sample of concentration 20 ng/mg. Figure 1 shows no significant interferences as any peaks at the expected retention times of analytes are detected; this demonstrates a good selectivity of the proposed method. Figure 2 shows a correct separation of cocaine and opiates during the chromatographic process with no interferences from other concomitant drugs.

**Table 2.** Limits of detection, limits of quantitation, and calibration results for the analytes

Compound	LOD (ng/mg)	LOQ (ng/mg)	Equation	R <sup>2</sup>
Cocaine	0.04	0.50	$y = 0.27x$	0.99
BE	0.04	0.50	$y = 0.18x$	0.99
Codeine	0.02	0.50	$y = 0.27x$	0.99
Morphine	0.04	0.50	$y = 0.25x$	1.00
6AM	0.05	0.50	$y = 0.17x$	0.99

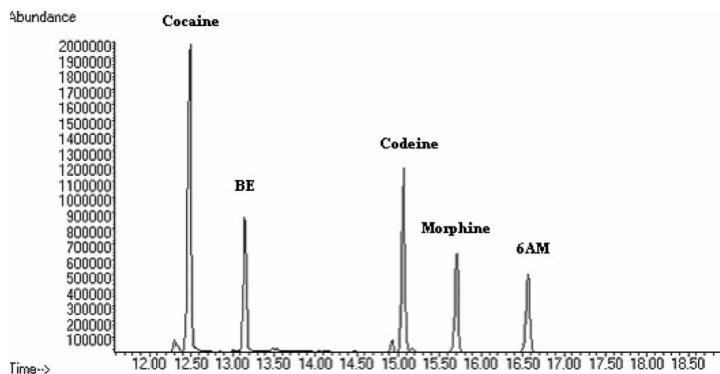
LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantitation.



**Figure 1.** Chromatogram for a blank hair sample.

Table 3 provides the results from the validation studies for all analytes. The intra- and interbatch precision ranged from 0.2–11.9% and from 0.1–17.9%, respectively, while the intra- and interbatch accuracy ranged from 0.6–18.2% and from 0.04–13.9%, respectively. The results of the hair validation study showed that both the intra- and interbatch precision and accuracy for the method were satisfactory for all analytes. The recovery of the analytes at two concentrations (low and high) ranged from 66.7–96.7%.

Finally, the developed method was used to analyze 20 real hair samples collected from drug abusers (Table 4). The results that are over the dynamic range were recalculated after diluting the samples. A representative chromatogram of a real sample is presented in Fig. 3. Cocaine was detected at concentrations between 0.1 and 93.8 ng/mg (average: 10.0 ng/mg),



**Figure 2.** Chromatogram for concentration 20 ng/mg.

**Table 3.** Results from the validation studies for the analytes

		Recovery (%)	Intrabatch study (n = 5)		Interbatch study (n = 6)	
Concentration added (ng/mg)			C.V. (%)	Relative mean error (%)	C.V. (%)	Relative mean error (%)
Cocaine	0.5	—	9.68	3.86	13.7	8.77
	1	—	—	—	11.2	0.61
	2	89.2	1.70	4.86	9.20	0.04
	4	—	—	—	5.92	1.95
	12	95.3	—	—	4.86	1.24
	20	—	3.92	0.66	1.95	0.37
BE	0.5	—	5.95	15.5	9.00	2.70
	1	—	—	—	7.63	2.96
	2	89.9	2.86	2.50	2.96	4.30
	4	—	—	—	3.00	2.38
	12	96.7	—	—	2.04	1.11
	20	—	0.24	0.62	1.49	0.20
Codeine	0.5	—	11.21	12.4	17.9	13.9
	1	—	—	—	13.9	2.71
	2	76.6	2.11	0.68	7.37	2.21
	4	—	—	—	9.07	3.36
	12	68.0	—	—	5.48	0.09
	20	—	4.06	2.89	2.78	0.18
Morphine	0.5	—	11.87	18.2	6.14	10.0
	1	—	—	—	0.13	4.32
	2	81.3	1.33	5.59	1.80	2.12
	4	—	—	—	2.70	2.07
	12	66.7	—	—	1.92	0.40
	20	—	0.21	0.70	0.66	0.02
6AM	0.5	—	7.34	4.44	12.2	9.91
	1	—	—	—	13.7	8.16
	2	89.2	6.24	4.31	7.47	6.82
	4	—	—	—	10.5	4.61
	12	88.2	—	—	4.64	0.55
	20	—	1.80	2.70	1.92	0.46

BE at concentrations between 0.2 and 55.7 ng/mg (average: 5.7 ng/mg), codeine at concentrations between 0 and 5.1 ng/mg (average: 0.7 ng/mg), morphine at concentrations between 0 and 31.1 ng/mg (average: 3.6 ng/mg), and 6AM at concentrations between 0 and 157.7 ng/mg (average: 15.6 ng/mg). In the majority of cases, the opiates were not detected.

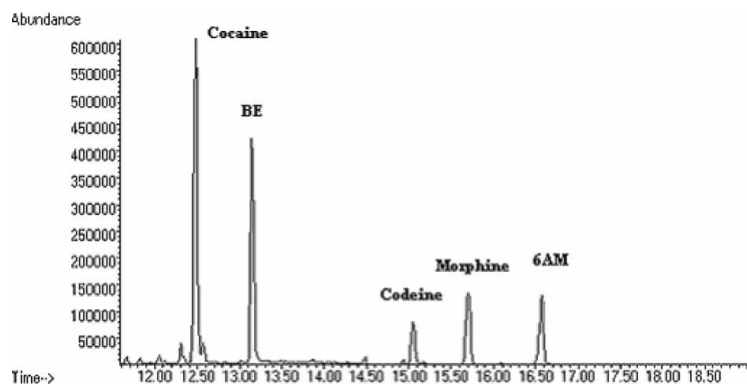


**Table 4.** Concentration of the analytes in human hair samples (ng/mg)

Patient	Cocaine	BE	Codeine	Morphine	6AM
1	3.33	2.20	—	—	—
2	4.06	2.49	—	—	—
3	2.73	2.87	—	—	—
4	3.90	2.28	—	—	—
5	3.66	2.36	—	—	—
6	3.93	2.33	—	—	—
7	2.38	2.03	—	—	—
8	0.71	0.55	0.51	1.54	2.09
9	1.65	0.80	0.51	1.29	4.41
10	1.85	1.11	0.29	0.61	4.14
11	2.08	2.42	—	—	—
12	1.80	2.30	—	—	—
13	1.56	2.22	—	—	—
14	0.41	0.28	—	—	—
15	0.10	0.19	—	—	—
16	1.71	0.79	—	1.77	0.23
17	10.49	5.09	2.29	6.93	4.42
18	20.3	18.3	2.49	8.75	43.2
19	39.7	55.7	3.80	20.2	95.4
20	93.8	6.78	5.11	31.1	158

#### 4. CONCLUSION

An optimized and analytical procedure able to identify and quantify opiates, cocaine, and its metabolite benzoylecgonine in hair samples was developed.



**Figure 3.** Chromatogram of the real sample (cocaine, 10.49 ng/mg; BE, 5.09 ng/mg; codeine, 2.29 ng/mg; morphine, 6.93 ng/mg; and 6AM, 4.42 ng/mg).

The extraction of the hair samples with Waters Oasis HLB cartridges warrants high recovery of the analytes, with no significant loss of any of the five compounds during the sample pretreatment. GC-MS was found to be specific, sensitive, and selective enough for determining the low drug concentrations to be expected in hair. Consequently, the method meets the sensitivity and the selectivity requirements of clinical and forensic toxicology.

## REFERENCES

- Bogusz, M.J. 2000. Liquid chromatography-mass spectrometry as a routine method in forensic sciences: a proof of maturity. *J. Chromatogr. B*, 748: 3–19.
- U.S. Department of Health and Human Services, Guidance for Industry. In *Bioanalytical Method Validation*. 2003 Food and Drug Administration. Cited Janu. 21st. Available at: [www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf](http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf).
- Franke, J.P. and de Zeeuw, R.A. 1998. Solid-phase extraction procedures in systematic toxicological analysis. *J. Chromatogr. B*, 713: 51–59.
- Kintz, P. and Mangin, P. 1993. Opiate concentrations in human head, axillary, and pubic hair. *J. Forensic Sci.*, 38: 657–662.
- Lewis, D., Moore, C., Morrissey, P., and Leikin, J. 1997. Determination of drug exposure using hair: application to child protective cases. *Forensic Sci. Int.*, 84: 123–128.
- Maurer, M.H. 1998. Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic and clinical toxicology. *J. Chromatogr. B*, 713: 3–25.
- Montagna, M., Stramesi, C., Vignali, C., Groppi, A., and Poletti, A. 2000. Simultaneous hair testing for opiates, cocaine, and metabolites by GC-MS: a survey of applicants for driving licenses with a history of drug abuse. *Forensic Sci. Int.*, 107: 157–167.
- Offidani, C., Strano Rossi, S., and Chiarotti, M. 1993. Improved enzymatic hydrolysis of hair. *Forensic Sci. Int.*, 63: 171–174.
- Pepin, G. and Gaillard, Y. 1997. Concordance between self-reported drug use and findings in hair about cocaine and heroin. *Forensic Sci. Int.*, 84: 37–41.
- Romolo, F.S., Rotolo, M.C., Palmi, I., Pacifici, R., and Lopez, A. 2003. Optimized conditions for simultaneous determination of opiates, cocaine and benzoylecgonine in hair samples by GC-MS. *Forensic Sci. Int.*, 138: 17–26.
- Sachs, H. 1997. History of hair analysis. *Forensic Sci. Int.*, 84: 7–16.
- Skender, L., Karačić, V., Brčić, I., and Bagarić, A. 2002. Quantitative determination of amphetamines, cocaine, and opiates in human hair by gas chromatography/mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.*, 125: 120–126.
- Tagliaro, F., Smith, F.P., De Battisti, Z., Manetto, G., and Marigo, M. 1997. Hair analysis, a novel tool in forensic and biomedical sciences: new chromatographic and electrophoretic/electrokinetic analytical strategies. *J. Chromatogr. B*, 689: 261–271.

# Improvements on Enzymatic Hydrolysis of Human Hair for Illicit Drug Determination by Gas Chromatography/Mass Spectrometry

Martha Míguez-Framil,<sup>†</sup> Antonio Moreda-Piñeiro,<sup>†</sup> Pilar Bermejo-Barrera,<sup>\*,†</sup> Patricia López,<sup>‡</sup> María Jesús Tabernero,<sup>‡</sup> and Ana María Bermejo<sup>‡</sup>

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry, and Department of Legal Medicine, Faculty of Medicine, University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

The use of ultrasound energy for accelerating the pronase E enzymatic hydrolysis of human hair for extracting illicit drugs has been novelty tested. The enzymatic extracts obtained after 30 min of sonication in an ultrasonic water bath were subjected to an optimized solid-phase extraction process, which involved a solution of 2.0% (v/v) acetic acid in methanol as eluting solution and concentration by N<sub>2</sub> stream evaporation. A gas chromatography/mass spectrometry method was used to separate and determine cocaine, benzoylecgonine, codeine, morphine, and 6-monoacetylmorphine in 20 min. Variables affecting ultrasound-assisted pronase E hydrolysis such as hydrolysis temperature, hydrolysis time, enzyme concentration, catalyzer (1,4-dithiothreitol) concentration, ionic strength, pH, and ultrasound frequency were simultaneously evaluated by a Plackett-Burman design 2<sup>8</sup> PBD of resolution III. The most statistically significant variables were ionic strength and pH, which means that analyte extraction is mainly attributed to pronase E activity. The optimization or evaluation of all the factors has led to an accelerated pronase E hydrolysis of human hair, which can be completed in 30 min. Results have been found to be statistically similar to those obtained with conventional pronase E hydrolysis. The accelerated method was finally applied to several human hair samples from multidrug abusers.

Hair analysis for drugs is a well-established and recommended methodology in the forensic field. Human hair is used as a forensic sample not only for cocaine, cannabis, and opiate determination but also for new recreational drugs such as amphetamine and amphetamine-like drugs. Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) is the most commonly used technique when separating and determining illicit drugs and their metabolites due to its high specificity, sensitivity, and cost. Immunological assays, although less costly than GC/MS or high-performance liquid chromatography–mass spectrometry (HPLC–MS), are less sensitive and cannot guarantee specificity. Both sensitivity and specificity are

also offered by HPLC–MS, but high solvent and gas consumption make this technique more expensive than GC. However, as recently reviewed by Miki et al.,<sup>1</sup> GC/MS requires tedious sample pretreatments before analysis, which makes the overall procedure time-consuming, creating difficulty when coping with large numbers of samples.

Since the pioneering review by Chiarotti on illicit drug extraction from hair,<sup>2</sup> extraction treatments based on the use of methanol, aqueous acids, or buffer solutions, alkaline digestions with aqueous sodium hydroxide, and enzymatic digestions are still the most commonly reported sample pretreatments for isolating illicit drugs from the hair matrix.<sup>3,4</sup> Supercritical fluid extraction with CO<sub>2</sub> has also been used to extract illicit drugs from hair samples.<sup>3,5–7</sup> However, as reported by Pragst and Balikova,<sup>3</sup> this method is seldom used due to high cost. Drastic alkaline conditions due to the use of aqueous sodium hydroxide lead to an efficient solubilization of the keratin matrices. However, alkaline conditions must be avoided when determining unstable compounds under alkaline conditions, such as cocaine.<sup>2</sup> Similarly, aqueous acid solutions can also hydrolyze some analytes, for instance, partial hydrolysis of cocaine to benzoylecgonine (BZE) or 6-monoacetylmorphine (6-MAM) to morphine.<sup>3</sup> It should be mentioned that according to results from the third proficiency test organized by the Society of Hair Testing (SoHT), acidic hydrolysis can offer higher yields for cocaine, opiates, and their metabolites than those obtained using enzymatic or methanol hydrolysis.<sup>8</sup> However, conclusions from this study are not totally reliable due to high relative standard deviation (RSDs). Therefore, hair pretreatments by using moderate pHs are more useful when analytes of different stability must be isolated under the same operating conditions. In these cases, sample pretreatments based on extractions with methanol or enzymatic hydrolysis are preferable. The use of methanol as a solvent offers the advantage over enzymatic digestion methods that direct GC injections can be

(1) Miki, A.; Katagi, M.; Tsuchihashi, H. *J. Health Sci.* **2003**, *49*, 325–332.

(2) Chiarotti, M. *Forensic Sci. Int.* **1993**, *63*, 161–170.

(3) Pragst, F.; Balikova, M. A. *Clin. Chim. Acta* **2006**, *370*, 17–49.

(4) Srogi, K. *Anal. Lett.* **2006**, *39*, 231–258.

(5) Morrison, J. F.; Chesler, S. N.; Yoo, W. J.; Selavka, C. M. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 163–172.

(6) Allen, D. L.; Oliver, J. S. *Forensic Sci. Int.* **2000**, *107*, 191–199.

(7) Brewer, W. E.; Galipo, R. C.; Sellers, K. W.; Morgan, S. L. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2371–2376.

(8) Jurado, C.; Sachs, H. *Forensic Sci. Int.* **2003**, *133*, 175–178.

\* To whom correspondence should be addressed. E-mail: pbermejo@usc.es.

<sup>†</sup> Department of Analytical Chemistry.

<sup>‡</sup> Department of Legal Medicine.

performed without cleanup of the hair extracts. However, uncompleted analyte recoveries are commonly obtained, and formation of methyl esters derivatives has been reported.<sup>3</sup>

Because moderate pH and temperature conditions are required when using enzymatic hydrolysis processes, proteolytic enzyme-based treatments can be useful for extracting illicit drugs from hair without analyte hydrolysis. Enzymatic or enzymic hydrolysis consists in reducing disulfide bonds of keratins under certain environmental conditions such as pH, temperature, and ionic strength. After enzymatic hydrolysis action, a variable fraction of analyte is released from the hair matrix and can be properly measured. Pronase E and proteinase K are the most commonly used enzymes for hydrolyzing hair proteins,<sup>2,3,9–12</sup> although a  $\beta$ -glucuronidase/arylsulfatase mixture has also been proposed,<sup>13</sup> Offidani et al. improved the enzymatic hydrolysis of hair using 1,4-dithiothreitol (DTT) and sodium dodecyl sulfate during the enzyme treatment.<sup>9</sup> The presence of DTT increases the analyte (cocaine) extraction ratio when the reagent is incubated with the hair sample during<sup>9,12</sup> or prior<sup>10,11</sup> to the enzymatic hydrolysis. It has been reported that the extraction yields of opiates (codeine, morphine, and 6-MAM), cocaine, and BZE are higher when using enzymatic hydrolysis than with the use of alkaline- and methanol-based extraction procedures.<sup>14</sup>

Furthermore, enzymatic hydrolysis methods are more expensive than methanol- and acid-based treatments. An important drawback of enzymatic hydrolysis is the long time required for completing the hydrolysis process, commonly in the range of 6–24 h. This fact, together with the use of an efficient cleanup method, makes enzymatic hydrolysis of hair to be a tedious and time-consuming methodology. Recently, ultrasound energy has been successfully applied for speeding up enzymatic hydrolysis of biological materials for trace elements and organometallic species extraction.<sup>15,16</sup> Typical enzymatic hydrolysis times with conventional thermostatic incubation were reduced from between 5 and 16 h to 30 min when using ultrasonic water baths<sup>15</sup> and further reduced to 2 min when using ultrasonic probes.<sup>16</sup> Ultrasound waves promote an increase of pressure and temperature due to bubble collapse (induced cavitations process). The asymmetric cavity collapse when a solid phase is immersed into a liquid phase produces high-speed jets of liquid, which impact on the solid surface.<sup>17</sup> As proposed by Wolf et al.,<sup>18</sup> when extracting metallothioneins from biological materials under ultrasound waves,

these impacts must disrupt the cell membranes, and the cytosolic content is more easily attacked by enzymes, allowing a shortened pretreating time.<sup>15</sup>

The aim of the current study has been the novel application of ultrasound energy to accelerate human hair enzymatic hydrolysis for isolating illicit drugs. Pronase E has been used as a proteolytic enzyme, and the effect of DDT has also been evaluated. Cocaine, BZE, codeine, morphine, and 6-MAM were simultaneously extracted from human hair samples and analyzed by an optimized GC/MS procedure.<sup>19</sup> Variables affecting the ultrasound-assisted pronase E hydrolysis of human hair were fully studied by application of an experimental design approach.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Apparatus.** GC/MS analysis was performed with a Hewlett-Packard model 6890 gas chromatograph (Hewlett-Packard, Avondale, PA), equipped with a HP-5 capillary column (30 m, 0.22-mm i.d., 0.33- $\mu$ m film thickness of cross-linked 5% phenyl methyl silicone) and a HP 5973 mass spectrometer as a selective detector. A Raypa UCL-150 ultrasonic cleaner bath from R. Espinar S.L. (Barcelona, Spain) was used, with programmable for temperature and time and ultrasound frequencies of 17 and 35 kHz. Other equipment included the following: an ultracentrifuge Laborzentrifugen model 2K15 (Sigma, Osterode, Germany); an Orion 720A plus pH-meter with a glass–calomel electrode (Orion, Cambridge, UK); a Boxcult incubation camera (Selecta, Barcelona, Spain) coupled with an agitator Rotabit (Selecta); Univeba and Digiterm 3000542 thermostatic bathes (Selecta); a Reax 2000 mechanical stirrer (Heidolph, Kelheim, Germany); a Visiprep TM DL vacuum manifold from Supelco; a VLM EC1 metal block thermostat and N<sub>2</sub> sample concentrator from VLM (Leopoldshöhe-Greste, Germany); a Laser Coulter Series LS-100, Fraunhofer optical model (Coulter Electronics Inc.); Oasis HLB cartridges (3 cm<sup>3</sup>, 60 mg) from Waters (Milford, MA). The chemometrics package was Statgraphics Plus V 5.0 for Windows, 1994–1999 (Manugistics Inc., Rockville MD).

**Reagents.** Ultrapure water of resistance 18 MO cm<sup>-1</sup> was obtained from a Milli-Q purification device (Millipore Co., Bedford, MA). Pronase E, acetonitrile (gradient grade), methanol (gradient grade), DTT, sodium hydroxide, potassium chloride, boric acid, acetic acid, chlorotrimethylsilane (TMCS), and *N*-methyl-*tert*-butylsilyltrifluoroacetamide (BSTFA) were from Merck (Poole, U.K.). Hydrochloric acid, 37%, was from Panreac (Barcelona, Spain). Ammonium hydroxide was from Scharlau (Barcelona, Spain). Tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS) was from Sigma-Aldrich (Stenheim, Switzerland). Drug stock standard solutions were prepared from cocaine, BZE, codeine, morphine, and 6-MAM from Lipomed (Arlesheim, Switzerland). Deuterated drug stock standard solutions were prepared from cocaine-*d*<sub>3</sub> in acetonitrile, BZE-*d*<sub>3</sub> in methanol, codeine-*d*<sub>3</sub> in methanol, morphine-*d*<sub>3</sub> in methanol, and 6-MAM-*d*<sub>3</sub> in methanol from Cerillant.

**Hair Sample Pretreatments.** Hair samples were obtained from multidrug abusers from an addiction research center in Santiago de Compostela, Spain. Hair samples of 2–3 cm in length (~0.5 g in weight) were cut with round-point scissors from the vertex posterior region of the scalp. To establish the method's

- (9) Offidani, C.; Strano Rossi, S.; Chiarotti, M. *Forensic Sci. Int.* **1993**, *63*, 171–174.
- (10) Lucas, A. C.; Bermejo, A. M.; Tabernero, M. J.; Fernández, P.; Strano-Rossi, S. *Forensic Sci. Int.* **2000**, *107*, 225–232.
- (11) Kronstrand, R.; Nystrom, I.; Josefsson, M.; Hodgins, S. *J. Anal. Toxicol.* **2002**, *26*, 479–484.
- (12) Fernández, P.; León, M.; Bouzas, A. M.; Bermejo, A. M.; Tabernero, M. J. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2003**, *26*, 2003–2012.
- (13) Baptista, M. J.; Venâncio Monsanto, P.; Gouveia Pinho Marques, E.; Bermejo, A.; Avila, S.; Martelo Castanheira, A.; Margallo, C.; Barroso, M.; Nuno Vieira, D. *Forensic Sci. Int.* **2002**, *128*, 66–78.
- (14) Cirimele, V.; Kintz, P.; Mangin, P. *Biomed. Chromatogr.* **1996**, *10*, 179–182.
- (15) Peña-Farfal, C.; Moreda-Piñeiro, A.; Bermejo-Barrera, P.; Bermejo-Barrera, A.; Pinochet-Cancino, H.; de Gregori-Hernández, I. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 3541–3547.
- (16) Capelo, J. L.; Jiménez-Embún, P.; Madrid-Albarrán, Y.; Cámara, C. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 233–237.
- (17) Bermejo, P.; Capelo, J. L.; Mota, A.; Madrid, Y.; Cámara, C. *Trends Anal. Chem.* **2004**, *23*, 654–663.
- (18) Wolf, C.; Rösick, U.; Brätter, P. *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *372*, 491–494.

- (19) López, P.; Bermejo, A. M.; Tabernero, M. J.; Fernández, P.; Álvarez, I. *Anal. Lett.* **2006**, *39*, 2307–2316.

**Table 1. Retention Times and Qualifier and Quantifier Ions  $m/z$  for Analytes and Deuterated Derivates**

compound	retention time, min	ion, <sup>a</sup> $m/z$
cocaine	12.5	182, 198, 303
cocaine- $d_3$	12.5	185, 201, 306
BZE <sup>b</sup>	13.2	240, 82, 361
BZE- $d_3$ <sup>b</sup>	13.2	243, 85, 364
codeine <sup>b</sup>	15.1	178, 371, 234
codeine- $d_3$ <sup>b</sup>	15.1	181, 374, 237
morphine <sup>b</sup>	15.7	429, 236, 414
morphine- $d_3$ <sup>b</sup>	15.7	432, 239, 417
6-MAM <sup>b</sup>	16.6	399, 287, 340
6-MAM- $d_3$ <sup>b</sup>	16.6	402, 290, 343

<sup>a</sup> First ion is quantifier ion. <sup>b</sup> Analyte-TMS derivatives.

limit of detection, drug-free scalp hair from laboratory staff volunteers was used.

All samples were decontaminated by mechanical stirring in a diluted soap solution at physiological pH for 30 min at room temperature and several times with Milli-Q water to remove any drug potentially introduced through passive contamination, as well as dirt and grease on the hair's outer layer. The successful removal of the hair's external contamination was verified through the negative result after the analysis of the last washing solution. Finally, the decontaminated hair samples were oven dried at 40 °C for 24 h. Hair was carefully cut into small segments and then pulverized in a vibrating zircon ball mill for 20 min to ensure homogeneity. Pulverized hair samples (mean particle size of ~50  $\mu$ m, measured by laser diffraction) were kept either in sealed glass or in plastic bottles until time of use.

**Conventional Pronase E Enzymatic Hydrolysis Procedure.**<sup>19</sup> Approximately 50 mg of pulverized hair was weighed into the centrifuge tubes, and 500  $\mu$ L of a DTT solution (12 mg mL<sup>-1</sup> in TRIS-HCl buffer solution 0.1 M, pH 7.2) added, and the mixture was incubated at 40 °C for 2 h. Then, 500  $\mu$ L of a solution containing 2.0 mg mL<sup>-1</sup> pronase E in TRIS-HCl buffer solution 0.1 M, pH 7.2 was added, and the mixtures were incubated at 40 °C for 12 h. After ultracentrifugation at 3000 rpm for 15 min, the supernatant was subjected to a solid-phase extraction (SPE) cleanup process and derivatization.

**Ultrasound-Assisted Pronase E Enzymatic Hydrolysis Procedure.** After weighing ~50 mg of pulverized hair into centrifuge tubes, 500  $\mu$ L of a solution containing 20 mg mL<sup>-1</sup> DTT and 500  $\mu$ L of 2.5 mg mL<sup>-1</sup> pronase E both dissolved in TRIS-HCl buffer solution (1.4 M and pH 7.3) were added, and the mixtures were sonicated at 35 kHz and 30 °C for 30 min. Similarly, mixtures were ultracentrifuged at 3000 rpm for 15 min, and the supernatant (enzymatic digest) was cleaned by SPE. The analytes were then derivatized.

**Solid-Phase Extraction Cleanup and Derivatization.** Aliquots of 20  $\mu$ L of the different internal standard solutions (deuterated analytes) were added to a volume of 1 mL of the hair enzymatic digest. Then, the pH was adjusted to 9.2 by adding 1 mL of a 0.2 M/0.2 M sodium hydroxide/boric acid buffer solution, and the mixture was passed through conditioned Oasis HLB cartridges. After loading, the cartridges were rinsed with 2 mL of 95/5 Milli-Q water/methanol and 2 mL of 78/20/2 Milli-Q water/methanol/ammonium hydroxide, and the cartridges were vacuum-

**Table 2. Experimental Field Definition for the 2<sup>8</sup> × 3/32 Plackett-Burman Design<sup>a</sup>**

variable (symbol)	center	low level (-)	high level (+)
pronase E concn/mg mL <sup>-1</sup> (IP - E)	1.5	0.5	2.5
DDT concn/mg mL <sup>-1</sup>	20	10	30
hydrolysis temperature/°C (T)	30	20	40
hydrolysis time/min (t)	20	10	30
ultrasound frequency/kHz (F)	17.5	0	35
pH	6.75	6.00	7.50
ionic strength (TRIS-HCl concn)/M (IS)	0.50	0.25	0.75
dummy factor (D)	0	-1	+1

<sup>a</sup> Hair mass was 0.050 g for all experiments.

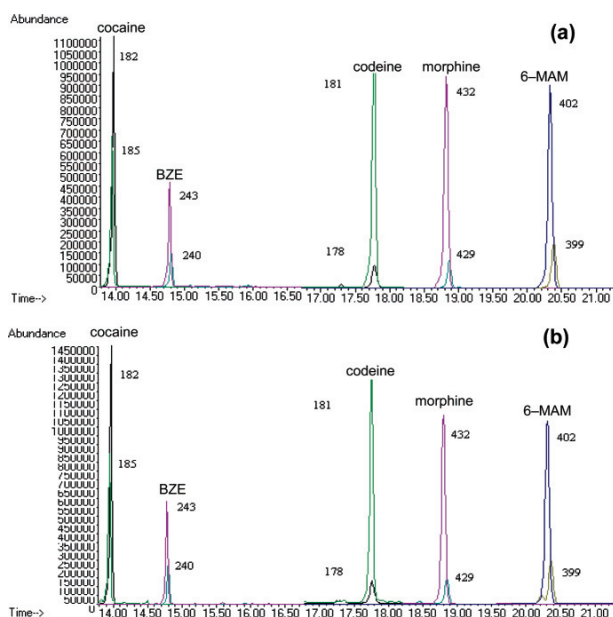
dried for 20 min. The adsorbed analytes were eluted with 2 mL of 2% acetic acid in methanol, and the eluates were evaporated under a stream of N<sub>2</sub> at 40 °C to dryness. The dry extract was derivatized with 40  $\mu$ L of BSTFA/TMCS 99/1 at 100 °C for 20 min. The extracts were kept at room temperature for 20 min before analysis.

**Gas Chromatography/Mass Spectrometry Measurements.**<sup>19</sup> GC/MS measurements were performed with the splitless injection mode (2 min) using 2  $\mu$ L as injection volume. The temperatures of the injection port and ion source were set at 240 and 300 °C, respectively. The column temperature was initially held at 90 °C for 1 min, then raised by 30 °C/min to 190 °C, maintained at 190 °C for 1 min, then increased to 260 °C at 8 °C/min, and maintained at 260 °C for 5 min. Finally, oven temperature was increased to 290 °C, and this temperature was maintained for 5 min in order to clean the column. The carrier gas was helium at a flow rate of 1 mL/min. The mass spectrometer used electron impact ionization (70 eV). Compounds were identified by using the retention time and the relative abundance of three confirming ions with respect to the target. Quantitative data were obtained by selected ion monitoring for each compound and internal standard. Retention times and ion currents at  $m/z$  for monitoring cocaine, BZE, codeine, morphine, 6-MAM, and the deuterated derivatives are listed in Table 1. Deuterated derivatives at a concentration of 10 mg L<sup>-1</sup> were used as internal standards. As an example, Figure 1 shows two chromatograms obtained after the optimized ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis (a) and a conventional enzymatic hydrolysis (b). A good correlation between peak schemes and retention times can be seen.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Variables Affecting the Ultrasound-Assisted Enzymatic Hydrolysis.** As previously reported, temperature, pH, and ionic strength are the main variables affecting enzymatic hydrolysis.<sup>20</sup> The effects of these variables and other parameters such as enzyme (pronase E) and DTT concentrations, ultrasound frequency, and sonication (enzymatic hydrolysis) time were simultaneously evaluated by using an experimental design approach. The screening design consisted of a 2<sup>8</sup> × 3/32 type III resolution Plackett-Burman design (PBD), for 8 factors, 4 degrees of

(20) Holme, D. J.; Peck, H. *Analytical Biochemistry*, 2nd ed.; Wiley & Sons: New York, 1994.



**Figure 1.** Chromatograms for drug separation after ultrasound-assisted pronase E hydrolysis (a) and conventional pronase E hydrolysis (b): cocaine (12.5 min), BZE (13.2 min), codeine (15.1 min), morphine (15.7 min), and 6-MAM (16.6 min).

**Table 3. Mean Slopes for Calibration and Detection and Quantification Limits**

	mean calibration slope $\pm$ SD <sup>a</sup>	LOD <sup>b</sup> / $\mu\text{g g}^{-1}$	LOQ <sup>b</sup> / $\mu\text{g g}^{-1}$
cocaine	0.274 $\pm$ 0.032	0.04	0.13
BZE	0.184 $\pm$ 0.005	0.04	0.13
codeine	0.273 $\pm$ 0.028	0.02	0.07
morphine	0.250 $\pm$ 0.002	0.04	0.13
6-MAM	0.166 $\pm$ 0.029	0.05	0.17

<sup>a</sup>  $n = 6$ , <sup>b</sup>  $n = 1$ .

freedom, 12 runs, and 2 replicates. Table 2 lists the low (–), high (+), and center values assigned to each variable. The variable pH was fixed by using a TRIS-HCl buffer solution, while the variable ionic strength was related to the concentration of the buffer system used to fix the pH. It can be seen that the PBD includes an eighth variable, called the dummy factor, in which statistical significance can show the presence of systematic error throughout the process or the existence of an important variable that was not taken into account.<sup>21</sup> Finally, the response variables were the concentrations ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) of each drug or metabolite measured by GC/MS (Table 1). The concentrations after each experiment (random combinations of the studied variables) are

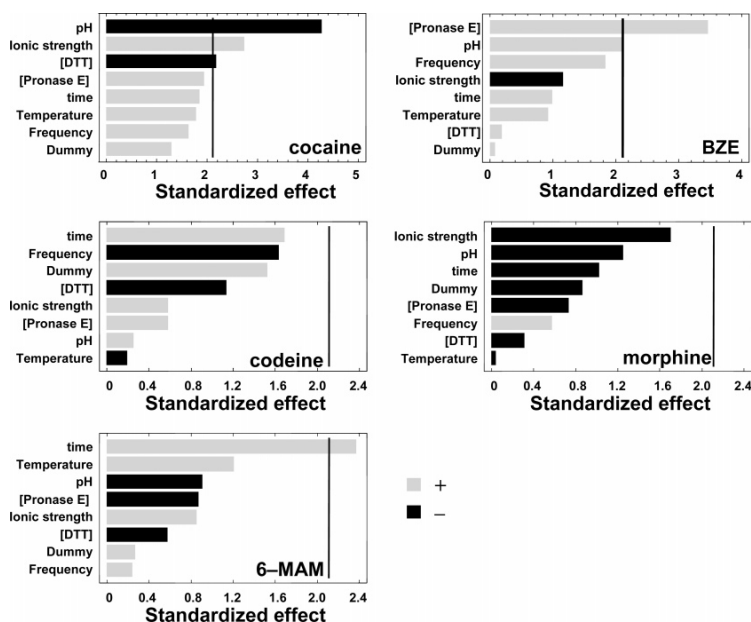
listed in Table S1 (given as Supporting Information). The analyte concentrations after performing the conventional enzymatic hydrolysis process are also listed in Table S1 as reference values (two replicates, A and B). The statistical evaluation at a 95.0% confidence interval gives the statistical significance of each variable through a  $t$  value calculated by the Statgraphics package,<sup>22,23</sup> which is 2.46 in the current statistical analysis. These results can be given as Pareto charts (Figure 2), in which those variables showing a standardized effect ( $t$  value) higher than  $\pm 2.46$  can be considered as statistically significant factors. It can be seen that pH is statistically significant for cocaine (negative effect) and BZE (positive effect), while it is nonstatistically significant for codeine, morphine, and 6-MAM. These results agree with literature data regarding cocaine instability at alkaline conditions<sup>2</sup> and BZE instability at acid conditions,<sup>3</sup> and literature data regarding non pH dependence of morphine and codeine.<sup>2</sup> The variable ionic strength is significant for cocaine extraction while enzymatic time is important when extracting 6-MAM. The concentrations of pronase E and DDT were statistically significant for BZE and cocaine, respectively. Finally, temperature, ultrasound frequency, and the dummy factor were nonsignificant variables.

The significance of pH and ionic strength can mean that, although the hydrolysis process has been assisted by ultrasounds, the nature of drug releasing is attributed to enzymatic activity, being mainly controlled by both pH and ionic strength. The

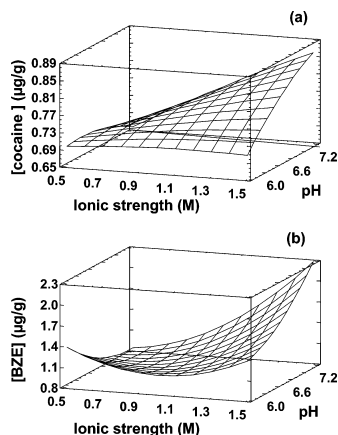
(21) Gardiner, W. P.; Gettinby, G. *Experimental design techniques in statistical practice, A practical software-based approach*; Horwood Publishing Limited: West Sussex, UK, 1998.

(22) Lewis, G. A.; Mathieu D.; Phan-Tan-Luu, R. *Pharmaceutical Experimental Design*; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1999.

(23) Lenth, R. V. *Technometrics* **1989**, 31, 469–473.



**Figure 2.** Standardized main effect Pareto chart for ultrasound-assisted pronase E hydrolysis of human hair.



**Figure 3.** Estimated response surfaces from the central composite design: cocaine (a) and BZE (b).

variable temperature appears to be less important than pH and ionic strength, and these results agree with those previously reported when using ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis for extracting metals and organometallic compounds.<sup>15,16</sup> It should be mentioned that there are not any statistically significant factors affecting codeine and morphine extraction. This means that both

**Table 4. Analytical Recovery of the Overall Procedure ( $n = 4$ )**

added concn/ ng mg <sup>-1</sup>	analytical recovery/%	RSD/%
cocaine		
2.00	89.2	2.5
12.0	95.3	3.4
BZE		
2.00	89.9	2.2
12.0	96.7	4.4
codeine		
2.00	76.6	7.0
12.0	68.0	2.7
morphine		
2.00	81.3	0.6
12.0	66.3	2.3
6-MAM		
2.00	89.2	1.6
12.0	88.2	2.5

analytes are efficiently extracted under large ranges of operating conditions (similar codeine and morphine concentrations after each experiment in Table S1). This fact agrees with the acid behavior of both opiates, which leads to a less efficient incorporation of these drugs into the hair matrix. It has been established that a combination of basicity and a certain portion of hydrophobicity provide ideal conditions for incorporation of drugs into hair.<sup>4,24</sup> The basic characteristics of cocaine and BZE link

(24) Morrison, J. F.; Chesler, S. N.; Yoo, W. J.; Selavka, C. M. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 163–172.

**Table 5. Minimum and Maximum Concentrations of Cocaine, BZE, Codeine, Morphine, and 6-MAM in Human Hair from Drug Abusers after Ultrasound-Assisted Pronase E Enzymatic Hydrolysis and Conventional Pronase E Enzymatic Hydrolysis and  $t_{ab}$  and  $t_{exp}$  after  $t$ -Paired Test (95% Confidence Level)**

	concentrations of drugs (ng mg <sup>-1</sup> )				
	cocaine	BZE	codeine	morphine	6-MAM
ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis	0.52–61.1	0.24–114	0.29–2.54	<0.13–0.91	<0.17–2.16
conventional enzymatic hydrolysis	0.46–53.4	0.14–83.3	0.32–1.73	<0.13–0.70	<0.17–2.03
$N^a$	10	10	10	4	6
$t_{ab}^b$	2.26	2.26	2.26	3.18	2.57
$t_{exp}^c$	1.72	–0.79	0.33	–0.72	2.02

<sup>a</sup>  $N$  is the number of human hair samples. <sup>b</sup> Student  $t$ -test for 95% confidence level and  $N - 1$  degrees of freedom. <sup>c</sup> Calculated  $t_{exp}$  after  $t$ -paired test (95% confidence level).

these drugs better to the hair matrix, and an efficient extraction is achieved only under certain conditions (some experiments in Table 3 lead to high cocaine and BZE concentrations).

**Optimization of Significant Variables by Central Composite Designs.** Since pH and ionic strength were the most significant factors for basic drugs (cocaine and BZE, drugs that are strongly bonded to the hair matrix), these two variables were fully optimized by applying a central composite design (CCD). The nonstatistically significant variables were fixed at convenient values such as temperature at 30 °C and ultrasound frequency at 35 kHz. The remaining variables were fixed according to results from PBD: time was set at 30 min because this variable was statistically significant (positive effect) for the extraction of 6-MAM; the concentration of enzyme (pronase E) was fixed at 2.5 mg mL<sup>-1</sup> since this variable was positively significant for BZE; finally, the concentration of DDT was 20 mg mL<sup>-1</sup> since this variable had shown a statistically significant effect (negative) for cocaine release from hair.

The variable pH was studied using low and high cube values of 6.0 and 7.5, respectively; while the definition field for the variable ionic strength was 0.5 M as low value and 1.5 M as high value. The experiments from the orthogonal 2<sup>2</sup> + star CCD (5 error degrees of freedom, 2 centers, 2 replicates, and 10 runs) together with the drug concentrations found after each set of conditions are shown in Table S2 (Supporting Information).

The statistical evaluation of quadratic terms has not resulted as significant for all cases, which implies that pH and ionic strength are independent variables. The response surfaces for cocaine and BZE are shown in Figure 3. The careful study of these figures leads to compromise conditions of 7.3 and 1.4 M for pH and ionic strength, respectively. Under these pH and ionic strength conditions, a high concentration of opiates is also obtained (response surfaces for morphine, codeine, and 6-MAM are given as Supporting Information in Figure S1).

**Analytical Performances.** Different calibration curves using deuterated derivatives as internal standards were obtained by fortifying aliquots of 50 mg of drug-free hair with standard mixtures, at increasing concentration levels, which were submitted to the enzymatic hydrolysis, extraction, and derivatization procedures described. These calibrations were performed in six different days and covered drug concentrations of 0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 12.0, and 20.0 µg g<sup>-1</sup> hair. Table 3 lists the mean and standard deviation of the slopes of calibration graphs for each drug. A good

repeatability of the calibration curves can be seen. According to the criteria of Bressolle et al.,<sup>25</sup> linearity of the method was demonstrated by showing that the slopes were statistically different from 0, the intercepts were not statistically different from 0, and the regression coefficients were not statistically different from 1 (regression coefficients were higher than 0.9993 for all cases).

The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ), based on the 3σ/10σ criterion,<sup>26</sup> were calculated by analyzing 11 replicates of a blank (enzymatic digest from drug-free hair). Taking into account the hair mass, the LODs and LOQs (expressed as µg g<sup>-1</sup>) are also listed in Table 3, where it can be seen that the values are low enough to apply the method to human hair from multidrug abusers.

Within-run precisions or intraday precision ( $n = 5$ ) was assessed for enzymatic digests spiked with 0.5, 2.0, and 20 µg g<sup>-1</sup> of each drug. Results, expressed as RSD, are listed in Table S3 (Supporting Information). Similarly, relative error was calculated by taking into account the spiked concentration and the found concentration after analysis. Results, expressed as percentages, are also given in Table 4. It can be seen that there is a good intraday precision as well as low intraday relative error.

The interday precision and the interday relative error were also assessed for enzymatic digests spiked with 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 12.0, and 20 µg g<sup>-1</sup> of each drug. These studies were performed on six different days. Results, expressed as RSD and relative error percentage, are given in Table S4 (Supporting Information). Similarly, acceptable values for both interday precision and interday relative error were reached.

The analytical recovery of the overall procedures was also studied after subjecting 50 mg of drug-free hair subsamples spiked with 2.0 and 12.0 µg g<sup>-1</sup> of each drug. After four independent ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis, cleanup, and GC/MS determination, the calculated analytical recoveries were those shown in Table 4. As can be seen, the recoveries are variable (ranging from 70 to 97%), which indicates good analytical recovery for all analytes.

**Applications.** The optimized ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis method was applied to 10 hair samples from multidrug

(25) Bressolle, F.; Bromet-Petit, M.; Audran, M. *J. Chromatogr., B* **1996**, *686*, 3–10.

(26) Abukhalaf, I. K.; Parks, B. A.; Silvestrov, N. A.; von Deutsch, D. A.; Mozayani, A.; Aboul-Enein, Y. *J. Liq. Chromatogr., Relat. Technol.* **2001**, *24*, 401–414.



abusers. The samples were also analyzed by using the conventional enzymatic hydrolysis process. Each hair sample was subjected to both ultrasound and conventional enzymatic hydrolysis processes twice, and each enzymatic digest was measured twice by GC/MS. Minimum and maximum concentrations for each drug are listed in Table 5, where it can be seen that all cases are positive for cocaine, BZE, and codeine. It can be also seen that drug concentrations after applying the optimized enzymatic hydrolysis process are similar to those obtained after the conventional enzymatic hydrolysis procedure. This fact has been confirmed by statistical analysis (Table 5).

## CONCLUSIONS

The application of ultrasound energy to assist pronase E enzymatic hydrolysis of human hair has been tried to shorten the long hydrolysis times commonly required when using pronase E enzymatic hydrolysis with conventional thermostatic devices. Results show that enzymatic hydrolysis can be performed by simultaneously using the enzyme (pronase E) and the catalyzer (DTT), completing the enzymatic hydrolysis process in 30 min. This amount of time is quite shorter than hydrolysis times for conventional procedures, commonly 12–24 h. Variables inherent

to the enzymatic activity, such as pH and ionic strength, have been found as the most significant. This means that the analytes' release can be attributed to the enzymatic action. The optimized accelerated method leads to quantitative recoveries for all drugs investigated, and the concentrations obtained are statistically similar to those obtained after pronase E hydrolysis based on conventional thermostatic devices. Therefore, the use of ultrasound to speed up the enzymatic hydrolysis of hair to assess drugs is a promising trend that must be fully exploited in the forensic field. The feasibility of ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis must be tested to assess other recreational drugs such as amphetamine derivatives.

## SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Additional information as noted in text. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

Received for review June 25, 2007. Accepted September 14, 2007.

AC071337N



# Capítulo

# 8

## Experimental:

Aplicación a muestras de  
vello púbico materno y  
cabello del recién nacido



## Capítulo 8. Experimental: Aplicación a muestras de vello púbico materno y cabello del recién nacido

<b>8.1</b>	PACIENTES Y MÉTODOS.....	201
<b>8.1.1</b>	DESARROLLO DEL ESTUDIO.....	201
<b>8.1.2</b>	TAMAÑO MUESTRAL .....	204
<b>8.1.3</b>	POBLACIÓN ESTUDIADA .....	204
<b>8.1.4</b>	TIPO DE MUESTRAS ANALIZADAS.....	205
<b>8.1.4.1</b>	VELLO PÚBLICO MATERNO .....	205
<b>8.1.4.2</b>	CABELLO DEL RECIÉN NACIDO.....	205
<b>8.1.5</b>	DETERMINACIÓN DE COCAÍNA Y/O OPIOIDES EN MUESTRAS DE VELLO PÚBLICO MATERNO Y CABELLO DEL RECIÉN NACIDO .....	205
<b>8.2</b>	RESULTADOS.....	206
<b>8.2.1</b>	RESULTADOS DE SCREENING.....	206
<b>8.2.2</b>	RESULTADOS DE CONFIRMACIÓN .....	207
<b>8.3</b>	ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS .....	208
<b>8.3.1</b>	ANÁLISIS ESTADÍSTICO BÁSICO .....	208
<b>8.3.1.1</b>	MATRIZ DE DATOS .....	208
<b>8.3.1.2</b>	PRETRATAMIENTO DE LOS DATOS .....	209
<b>8.3.1.3</b>	MATRIZ DE CORRELACIÓN.....	211
<b>8.3.1.3.1</b>	CORRELACIÓN COC-BE Y COD-MOR-6-MAM.....	213
<b>8.3.1.3.2</b>	CORRELACIÓN MADRE-RECIÉN NACIDO .....	216
<b>8.3.2</b>	RELACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS POSITIVOS Y NEGATIVOS EN LA MADRE Y EL RECIÉN NACIDO.....	222
<b>8.3.3</b>	RELACIÓN ENTRE EL CONSUMO MATERNO Y LAS POSIBLES ALTERACIONES EN EL RECIÉN NACIDO .....	223
<b>8.3.4</b>	INCIDENCIA DEL CONSUMO DE COCAÍNA Y OPIOIDES EN EL EMBARAZO.....	224
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	225



## **8.1 PACIENTES Y MÉTODOS**

### **8.1.1 DESARROLLO DEL ESTUDIO**

Durante un período de 1 año (entre Octubre de 2005 y Octubre de 2006) se ha invitado a participar en este estudio a 539 mujeres embarazadas atendidas en el Complejo Hospitalario Xeral Cíes de Vigo. A éstas se les ha explicado el objetivo y el modo de proceder del estudio en consultas externas y/o ingreso hospitalario. Del total de las gestantes invitadas, solamente 213 aceptaron participar en el estudio. Las mujeres embarazadas que aceptaron su inclusión en el mismo firmaron un consentimiento informado (Figura 8.1). El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de ensayos clínicos de Galicia.

La mayoría de las negativas a participar en el estudio se expresaron de alguna de las siguientes maneras: miedo a causar daño al recién nacido, temor a las secuelas del corte del mechón de cabello en el recién nacido, no encontrar ventajas en el caso de no consumir drogas que se lo confirmaran mediante un estudio, negativa a participar en un estudio en el que se les pudiese relacionar con drogas, desconfianza del uso que se le pudiera dar después a las muestras, estar de acuerdo con las condiciones del estudio pero en el momento de tener que firmar no querer hacerlo.

En el caso de madres consumidoras de drogas, muchas de las negativas se debían al miedo a un reconocimiento oficial de su drogadicción y al miedo a perder la tutela del recién nacido, a pesar de que el estudio era anónimo.

Otro factor importante que aumentaba el número de negativas era debido a que en el hospital se estaban llevando a cabo, paralelamente, otros dos estudios (uno sobre el consumo de fármacos y otro sobre sordera congénita) que requerían la colaboración de los pacientes y que eran obligatorios, por lo que las pacientes rechazaban la participación en otro nuevo estudio, pues éste era voluntario.

<p style="text-align: center;"><b><u>CONSENTIMIENTO INFORMADO</u></b></p> <p style="text-align: center;"><b>SE RUEGA AUTORIZACIÓN PARA ANÁLISIS TOXICOLÓGICO DEL VELLO PÚBLICO MATERNO Y/O CABELLO DEL RECIÉN NACIDO</b></p> <p>La muestra se extrae de forma inocua a través del rasurado habitual previo al parto. En el recién nacido se cortará con tijera roma en área occipital de la cabeza.</p> <p>La obtención de las muestras no supone ningún riesgo de infección ni de ninguna otra índole para el recién nacido ni para la madre. La cantidad de cabello requerida es equivalente a un mechón de cabello.</p> <p>Los resultados de los análisis que se realicen son confidenciales, anónimos y gozan de la misma protección legal aplicable con carácter general a todos los datos clínicos del paciente.</p> <p>Este estudio forma parte del proyecto de investigación correspondiente al programa de doctorado que se está llevando a cabo por el departamento de Medicina Legal y Toxicología de la Universidad de Santiago de Compostela. El protocolo se presenta y se aprueba a la comisión de docencia y al comité de Ética del Complejo Hospitalario Xeral-Cíes.</p> <p>Complejo Hospitalario Xeral-Cíes.</p> <p>Dña _____</p> <p>AUTORIZO a la obtención de la muestra en los términos y para la finalidad expresada en el presente documento.</p> <p>Vigo, a ____ de _____ de _____</p> <table border="0" style="width: 100%;"><tr><td style="width: 50%; text-align: center;">El facultativo/a</td><td style="width: 50%; text-align: center;">La paciente</td></tr></table>		El facultativo/a	La paciente
El facultativo/a	La paciente		

**Figura 8.1.** Modelo de consentimiento informado entregado a las gestantes que aceptan participar en el estudio.



Las mujeres incluidas en este estudio fueron entrevistadas para conocer datos de sus hábitos tóxicos, consumo de fármacos, complicaciones durante la gestación, etc. Asimismo se han recogido los datos siguientes reflejados en:

1. La historia clínica materna:

- Edad, estado civil.
- Enfermedades maternas:
  - o Enfermedades de transmisión sexual (VIH, gonorrea, sífilis, VHB, etc.)
  - o Otras enfermedades (psiquiátricas, neurológicas, cardiovasculares, etc.)
- Sospecha clínica o confirmada de drogadicción.
- Historia ginecológica:
  - o Previa: Número de embarazos (parto natural o cesárea), tratamiento de fertilidad, embarazos generales, abortos, parto prematuro, síndrome de abstinencia, muerte súbita o cualquier patología perinatal.
  - o Actual: Número de visitas prenatales, embarazo de alto riesgo, parto instrumentado, cesárea. Presencia de hipertensión, preeclampsia, eclampsia, desprendimiento prematuro de placenta o cualquier otra patología.

2. La historia clínica del neonato:

- Peso al nacer, semana de gestación, perímetro craneal, test de Apgar.
- Retraso del crecimiento fetal intrauterino, alteraciones neurológicas, microcefalia, malformaciones congénitas, evidencia de síndrome de abstinencia o cualquier otra eventualidad.

### **8.1.2 TAMAÑO MUESTRAL**

Del total de los consentimientos (213) solamente se consiguieron 154 muestras. De éstas, 120 procedían de Obstetricia (60 muestras de vello púbico materno y 60 de cabello del recién nacido) y 34 de Neonatología (17 muestras de vello púbico materno y 17 de cabello del recién nacido).

El bajo número de muestras recogidas se debió a que en muchas ocasiones se daba el alta hospitalaria a la gestante antes de la toma de muestra y a que en algunos casos, sobre todo en los prematuros, éstos carecían de cabello, por lo que tanto la madre como el recién nacido fueron excluidos del estudio.

### **8.1.3 POBLACIÓN ESTUDIADA**

La población de Obstetricia incluyó a gestantes sanas, sin patología previa ni sospecha de consumo de drogas y a sus recién nacidos. La edad de estas gestantes estaba comprendida entre los 19 y los 42 años, con un pico de frecuencia máximo entre los 30 y los 35 años. Todas habían llevado un embarazo controlado por el Sergas con, al menos, tres consultas al tocólogo, dos ecografías, dos analíticas y un cultivo en el tercer trimestre. Un 10% reconoció el uso de tabaco de forma crónica en el embarazo, un 8% reconoció fumar marihuana de forma ocasional en el embarazo, sin embargo ninguna admitió otro consumo ni crónico ni esporádico de COC y/o HER durante la gestación.

La población de Neonatología incluyó a gestantes con algún tipo de patología (preeclampsia, diabetes, VIH, hepatitis, etc.) y a sus recién nacidos, así como a gestantes que sin patología daban a luz a recién nacidos con alguna patología (ictericia, taquipnea, quejido, irritabilidad, etc.). En este caso, el pico de edad máximo fue menor que en el caso anterior, situándose entre los 20 y los 25 años. Todas las gestantes habían llevado embarazos no controlados, un 90% de ellas eran ex adictas a una o varias drogas y un 35% estaban a tratamiento con metadona. Sin embargo, solamente un 18% admitió consumo de drogas durante el embarazo, en estos casos los recién nacidos fueron dados en adopción por abandono materno. El resto de las madres no admitió consumo durante el embarazo, tan sólo reconocían uso esporádico de alcohol y de tabaco (92%) y uso esporádico de cánnabis (9%).

## 8.1.4 TIPO DE MUESTRAS ANALIZADAS

### 8.1.4.1 VELLO PÚBLICO MATERNO

Se recogieron muestras de vello púbico de las mujeres gestantes que aceptaron participar en el estudio. Estas muestras fueron obtenidas a partir del rasurado del parto gracias a la colaboración de las auxiliares clínicas de la sala de partos.

En los casos en los que la recogida del vello púbico no ha sido posible, se ha recogido el cabello materno de la zona occipital a ras del cuero cabelludo. El extremo cercano al cuero cabelludo y la zona distal han sido claramente identificados.

Ambas muestras de pelo fueron introducidas en bolsas plásticas para su traslado al Servicio de Toxicología del IUML de Santiago. Con carácter previo a este transporte, los datos fueron encriptados para conservar la confidencialidad.

En el laboratorio, las muestras recibidas fueron adecuadamente identificadas y almacenadas a temperatura ambiente hasta su análisis.

### 8.1.4.2 CABELLO DEL RECIÉN NACIDO

Las muestras de cabello fueron recogidas de todos los recién nacidos incluidos en el estudio durante su estancia hospitalaria (primeras 72 horas de vida).

Para estas muestras se ha seguido el mismo protocolo de encriptación, transporte y almacenamiento que en el caso de las muestras de cabello materno.

## 8.1.5 DETERMINACIÓN DE COCAÍNA Y/O OPIOIDES EN MUESTRAS DE VELLO PÚBLICO MATERNO Y CABELLO DEL RECIÉN NACIDO

Para la determinación de COC, BE, COD, MOR y 6-MAM en las muestras de vello púbico materno o cabello materno y de cabello del recién nacido, ha sido realizado un *screening* previo mediante RIA utilizando un método previamente estandarizado en nuestro laboratorio<sup>1</sup>. Los resultados de *screening* positivos para la BE y/o la MOR fueron confirmados y cuantificados utilizando el método GC-MS descrito en el capítulo anterior.

## 8.2 RESULTADOS

### 8.2.1 RESULTADOS DE SCREENING

Los resultados de *screening* de las muestras de vello púbico o cabello materno y de cabello del recién nacido obtenidos para cada una de las poblaciones estudiadas se muestran en la Tabla 8.1.

Solamente las muestras maternas 14 y 18 de Obstetricia y la 15 de Neonatología correspondían a muestras de cabello, el resto eran todas muestras de vello púbico.

**Tabla 8.1.** Resultados de *screening*.

	BE		MOR	
	MADRE	RECIÉN NACIDO	MADRE	RECIÉN NACIDO
<b>OBSTETRICIA</b>				
<b>1</b>	+	+	+	+
<b>2</b>	+	+	-	-
<b>3</b>	+	+	-	-
<b>4</b>	+	+	-	-
<b>5</b>	+	-	+	-
<b>6</b>	+	-	-	-
<b>7</b>	+	-	-	-
<b>8</b>	+	-	-	-
<b>9</b>	+	-	-	-
<b>10</b>	-	+	-	-
<b>11</b>	-	+	-	-
<b>12-60</b>	-	-	-	-
<b>NEONATOLOGÍA</b>				
<b>1</b>	+	+	-	-
<b>2</b>	+	+	-	-
<b>3</b>	+	+	-	-
<b>4</b>	+	+	-	-
<b>5</b>	+	+	-	-
<b>6</b>	+	-	+	-
<b>7</b>	+	-	-	-
<b>8</b>	+	-	-	-
<b>9</b>	+	-	-	-
<b>10-17</b>	-	-	-	-

En la población de Obstetricia, del *screening* de las muestras maternas se obtuvieron 7 casos positivos a BE y 2 positivos a BE y MOR. Sin embargo, el *screening* de las muestras de los recién nacidos solamente proporcionó 5 casos positivos a BE y 1 positivo a BE y MOR.

De la misma forma, en la población de Neonatología, del *screening* de las muestras maternas se obtuvieron 8 casos positivos a BE y 1 positivo a BE y MOR. Sin embargo, el *screening* de las muestras de los recién nacido solamente proporcionó 5 casos positivos a BE y ninguno positivo a BE y MOR.

## 8.2.2 RESULTADOS DE CONFIRMACIÓN

Los resultados de confirmación mediante GC-MS de las muestras de vello púbico y de cabello del recién nacido con *screening* positivo se muestran en la Tabla 8.2.

**Tabla 8.2.** Resultados GC-MS de las muestras con *screening* positivo.

	Concentración vello púbico materno (ng/mg)					Concentración cabello recién nacido (ng/mg)				
	COC	BE	COD	MOR	6-MAM	COC	BE	COD	MOR	6-MAM
<b>OBSTETRICIA</b>										
<b>1</b>	9,72	2,06	3,31	7,08	18,5	1,09	0,89	<LOD	5,63	20,7
<b>2</b>	11,5	5,48	0	0	0	0,96	0,40	0	0	0
<b>3</b>	13,6	3,99	0	0	0	3,31	2,76	0	0	0
<b>4</b>	10,2	8,43	0	0	0	1,47	0,57	0	0	0
<b>5</b>	1,54	0,85	0,25	0,35	1,32			NA*		
<b>6</b>	2,82	2,17	0	0	0			NA		
<b>7</b>	<LOD	<LOD	0	0	0			NA		
<b>8</b>	1,89	0,61	0	0	0			NA		
<b>9</b>	<LOD	<LOD	0	0	0			NA		
<b>10</b>			NA			0,05	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
<b>11</b>			NA			0,05	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
<b>NEONATOLOGÍA</b>										
<b>1</b>	25,1	10,1	0	0	0	3,18	0,93	0	0	0
<b>2</b>	114	31,0	0	0	0	12,8	6,03	0	0	0
<b>3</b>	22,1	11,6	0	0	0	2,28	1,85	0	0	0
<b>4</b>	37,3	16,2	0	0	0	3,21	0,44	0	0	0
<b>5</b>	221	85,1	0	0	0	24,5	4,32	0	0	0
<b>6</b>	8,31	2,68	0	0	0			NA		
<b>7</b>	20,3	15,1	0,15	0,18	0,51			NA		
<b>8</b>	<LOD	<LOD	0	0	0			NA		
<b>9</b>	1,41	0,98	0	0	0			NA		

\*NA: No analizado.

A la vista de los resultados de las muestras de Obstetricia podemos observar que las muestras de vello púbico 7 y 9 (con *screening* positivo a BE) han resultado negativas para los cinco analitos de interés mediante GC-MS. Del mismo modo, la muestra de vello púbico 8 de Neonatología (con *screening* positivo a BE), también ha proporcionado un resultado negativo. Lo cual da lugar a 3 falsos positivos. El resto de los resultados de *screening* positivos han sido confirmados mediante GC-MS.

## **8.3 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS**

### **8.3.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO BÁSICO**

#### **8.3.1.1 MATRIZ DE DATOS**

En base a los resultados obtenidos mediante el análisis de GC-MS se ha realizado una matriz de datos (Tabla 8.3) con el fin de establecer dos tipos de correlación: correlación entre los cinco analitos y correlación entre las dos muestras. En cada columna de esta matriz se ha representado una variable. Las variables con las que hemos trabajado son 10: concentración de COC en la madre, COC (M); concentración de COC en el recién nacido, COC (RN); concentración de BE en la madre, BE (M); concentración BE en el recién nacido, BE (RN); concentración de COD en la madre, COD (M); concentración de COD en el recién nacido, COD (RN); concentración de MOR en la madre, MOR (M); concentración MOR en el recién nacido, MOR (RN); concentración de 6-MAM en la madre, 6-MAM (M) y concentración 6-MAM en el recién nacido, 6-MAM (RN). Todas estas concentraciones han sido expresadas en ng/mg. En cada una de las filas de la matriz se han representado los resultados GC-MS positivos a alguno de los compuestos estudiados en alguna de las matrices analizadas (9 de Obstetricia y 8 de Neonatología). Cuando el resultado GC-MS fue <LOD, 0 o cuando una determinada muestra no fue analizada mediante GC-MS por tener un *screening* negativo, en estos casos, en la matriz de datos se ha indicado el valor del LOD correspondiente, pues los valores 0 son anulados por el programa, por lo que no se podrían establecer las correlaciones.

**Tabla 8.3.** Matriz de datos.

	COC (M)	COC (RN)	BE (M)	BE (RN)	COD (M)	COD (RN)	MOR (M)	MOR (RN)	6- MAM (M)	6- MAM (RN)
<b>O1</b>	9,72	1,09	2,06	0,89	3,31	0,02	7,08	5,63	18,5	20,7
<b>O2</b>	11,5	0,96	5,48	0,4	0,02	0,02	0,04	0,04	0,05	0,05
<b>O3</b>	13,6	3,31	3,99	2,76	0,02	0,02	0,04	0,04	0,05	0,05
<b>O4</b>	10,2	1,47	8,43	0,57	0,02	0,02	0,04	0,04	0,05	0,05
<b>O5</b>	1,54	0,04	0,85	0,04	0,25	0,02	0,35	0,04	1,32	0,05
<b>O6</b>	2,82	0,04	2,17	0,04	0,02	0,02	0,04	0,04	0,05	0,05
<b>O8</b>	1,89	0,04	0,61	0,04	0,02	0,02	0,04	0,35	0,05	0,05
<b>O10</b>	0,04	0,05	0,04	0,04	0,02	0,02	0,04	0,04	0,05	0,05
<b>O11</b>	0,04	0,05	0,04	0,04	0,02	0,02	0,04	0,04	0,05	0,05
<b>N1</b>	25,1	3,18	10,1	0,93	0,02	0,02	0,04	0,04	0,05	0,05
<b>N2</b>	114	12,8	31	6,03	0,02	0,02	0,04	0,04	0,05	0,05
<b>N3</b>	22,1	2,28	11,6	1,85	0,02	0,02	0,04	0,04	0,05	0,05
<b>N4</b>	37,3	3,21	16,2	0,44	0,02	0,02	0,04	0,04	0,05	0,05
<b>N5</b>	221	24,5	85,1	4,32	0,02	0,02	0,04	0,04	0,05	0,05
<b>N6</b>	8,31	0,04	2,68	0,04	0,02	0,02	0,04	0,04	0,05	0,05
<b>N7</b>	20,3	0,04	15,1	0,04	0,15	0,15	0,18	0,04	0,51	0,05
<b>N9</b>	1,41	0,04	0,98	0,04	0,02	0,02	0,04	0,04	0,05	0,05

### 8.3.1.2 PRETRATAMIENTO DE LOS DATOS

Dado que en esta matriz alguna de las variables estudiadas tienen un valor numérico sensiblemente superior al resto de las variables que componen la matriz, es necesario homogenizar los datos con el fin de conferir la misma importancia o peso a cada una de las variables.

El pretratamiento de datos usado en este estudio ha sido la transformación rango medio ( $h_r$ , *half-range*) y valor central ( $cv$ , *central value*)<sup>2</sup> que se calculan en base a las siguientes ecuaciones:

$$h_r = \frac{1}{2}(x_{\max} - x_{\min})$$

**Ecuación 8.1.** Ecuación del rango medio.

$$cv = \frac{1}{2}(x_{\max} + x_{\min})$$

**Ecuación 8.2.** Ecuación del valor central.

donde  $x_{\max}$  y  $x_{\min}$  son la concentración máxima y mínima de cada variable, respectivamente. Así, todas las variables ( $x_i$ ) pueden ser transformadas en valores normalizados ( $z_i$ ) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$z_i = \frac{x_i - cv}{h_r}$$

**Ecuación 8.3.** Ecuación del valor normalizado.

De esta forma se obtiene la matriz de datos normalizada (Tabla 8.4) cuyos valores oscilan entre -1 y 1 (1 para valores máximos, -1 para valores mínimos y 0 para los valores centrales).



**Tabla 8.4.** Matriz de datos normalizada.

	COC (M)	COC (RN)	BE (M)	BE (RN)	COD (M)	COD (RN)	MOR (M)	MOR (RN)	6- MAM (M)	6- MAM (RN)
<b>O1</b>	-0,91	-0,91	-0,95	-0,72	1,00	-1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
<b>O2</b>	-0,90	-0,92	-0,87	-0,88	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00
<b>O3</b>	-0,88	-0,73	-0,91	-0,09	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00
<b>O4</b>	-0,91	-0,88	-0,80	-0,82	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00
<b>O5</b>	-0,99	-1,00	-0,98	-1,00	-0,86	-1,00	-0,91	-1,00	-0,86	-1,00
<b>O6</b>	-0,97	-1,00	-0,95	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00
<b>O8</b>	-0,98	-1,00	-0,99	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-0,89	-1,00	-1,00
<b>O10</b>	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00
<b>O11</b>	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00
<b>N1</b>	-0,77	-0,74	-0,76	-0,70	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00
<b>N2</b>	0,03	0,04	-0,27	1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00
<b>N3</b>	-0,80	-0,82	-0,73	-0,40	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00
<b>N4</b>	-0,66	-0,74	-0,62	-0,87	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00
<b>N5</b>	1,00	1,00	1,00	0,43	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00
<b>N6</b>	-0,93	-1,00	-0,94	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00
<b>N7</b>	-0,82	-1,00	-0,65	-1,00	-0,92	1,00	-0,96	-1,00	-0,95	-1,00
<b>N9</b>	-0,99	-1,00	-0,98	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00

### 8.3.1.3 MATRIZ DE CORRELACIÓN

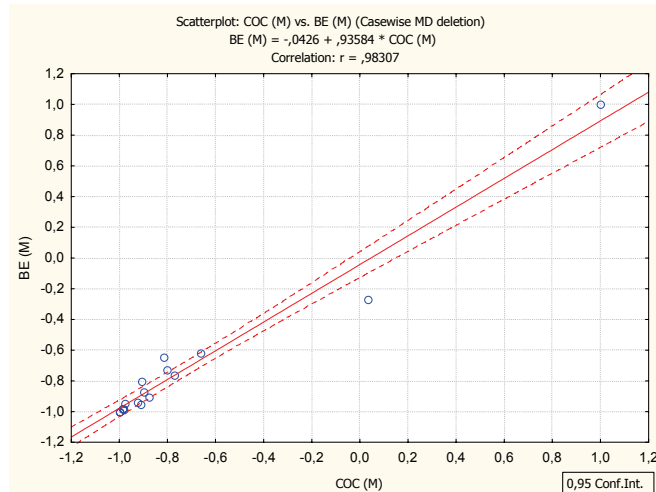
Una vez normalizados los datos se ha construido una matriz de correlaciones cuadrada (Tabla 8.5), usando el programa Statistics, y se ha comprobado numéricamente qué variables han aportado correlación numérica ( $\geq 0,70$ ).

Tabla 8.5. Matriz de correlaciones.

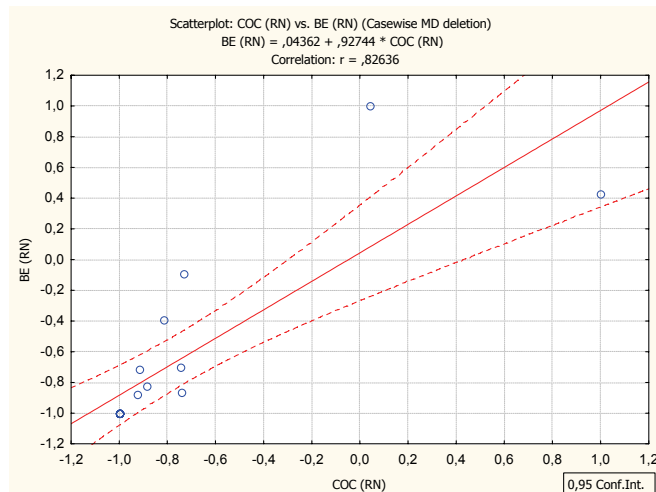
	COC (M)	COC (RN)	BE (M)	BE (RN)	COD (M)	COD (RN)	MOR (M)	MOR (RN)	6-MAM (M)	6-MAM (RN)
COC (M)										
COC (RN)	0,99									
BE (M)	0,98	0,97								
BE (RN)	0,79	0,83	0,70							
COD (M)	-0,10	-0,10	-0,12	-0,05						
COD (RN)	-0,04	-0,13	0,04	-0,16	-0,03					
MOR (M)	-0,10	-0,09	-0,12	-0,04	1,00	-0,04				
MOR (RN)	-0,10	-0,09	-0,12	-0,04	0,99	-0,07	1,00			
6-MAM (M)	-0,10	-0,09	-0,13	-0,05	1,00	-0,04	1,00	0,99		
6-MAM (RN)	-0,09	-0,08	-0,12	-0,03	1,00	-0,06	1,00	1,00	1,00	

### 8.3.1.3.1 CORRELACIÓN COC-BE Y COD-MOR-6-MAM

La COC y la BE se correlacionan bien en la madre y en el recién nacido, con coeficientes de correlación para la madre de 0,98 y para el recién nacido de 0,83 (Figuras 8.2 y 8.3, respectivamente).

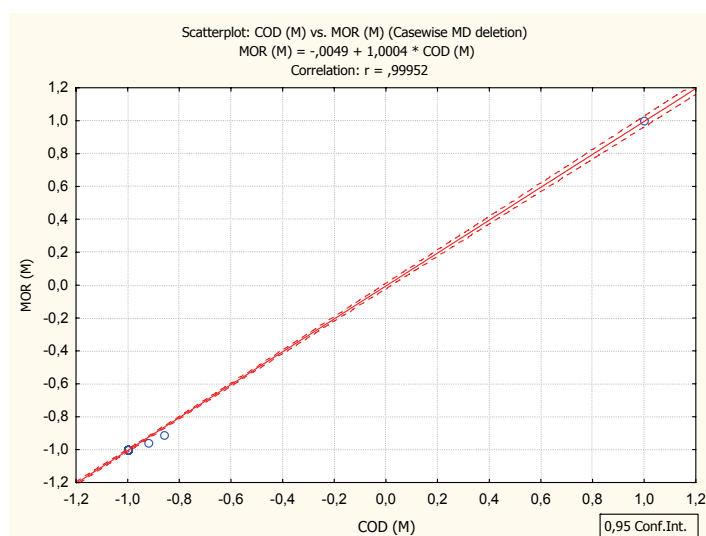


**Figura 8.2.** Correlación COC (M)-BE (M).

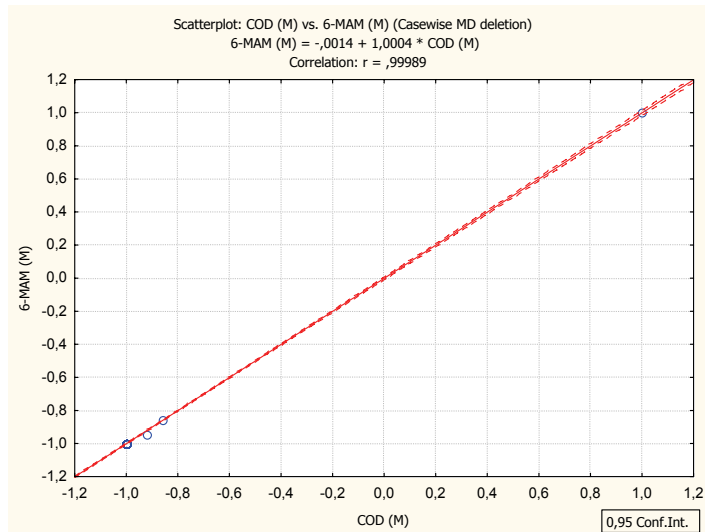


**Figura 8.3.** Correlación COC (RN)-BE (RN).

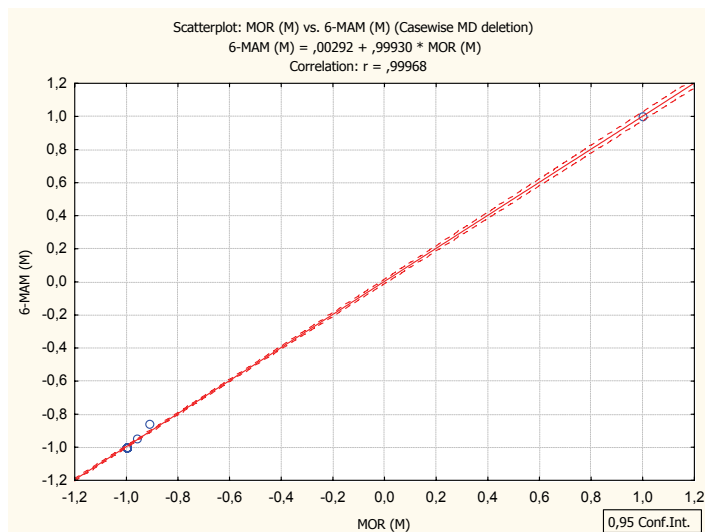
Los opioides estudiados en la madre parecen correlacionarse mejor que la COC y la BE, sin embargo, es necesario tener en cuenta que éstos han sido detectados en un menor número de casos. Así, puede observarse para la madre una correlación perfecta para la COD-MOR, COD-6-MAM y MOR-6-MAM (Figuras 8.4, 8.5 y 8.6). Sin embargo, en el recién nacido solo se ha observado buena correlación para la MOR-6-MAM (Figura 8.7). La COD del recién nacido no se correlaciona ni con la MOR ni con la 6-MAM del recién nacido debido a que ésta ha sido negativa en todos los casos.



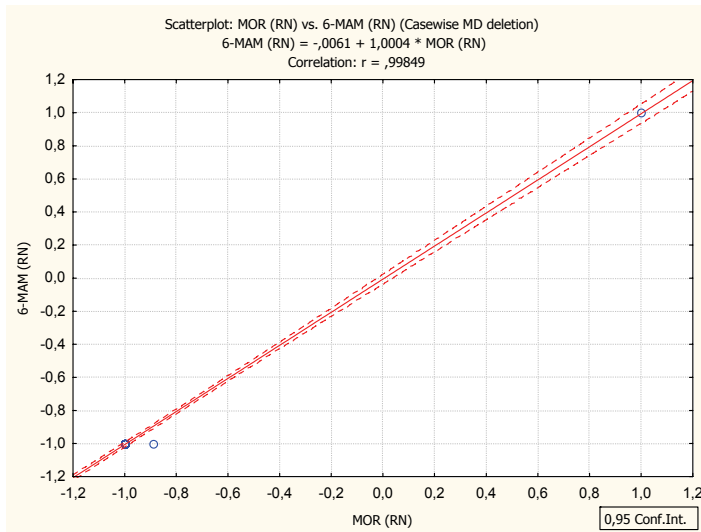
**Figura 8.4.** Correlación COD (M)-MOR (M).



**Figura 8.5.** Correlación COD (M)-6-MAM (M).



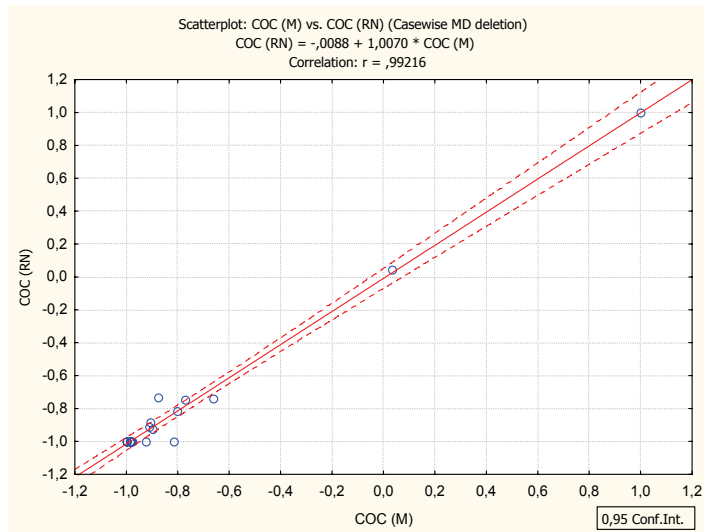
**Figura 8.6.** Correlación MOR (M)-6-MAM (M).



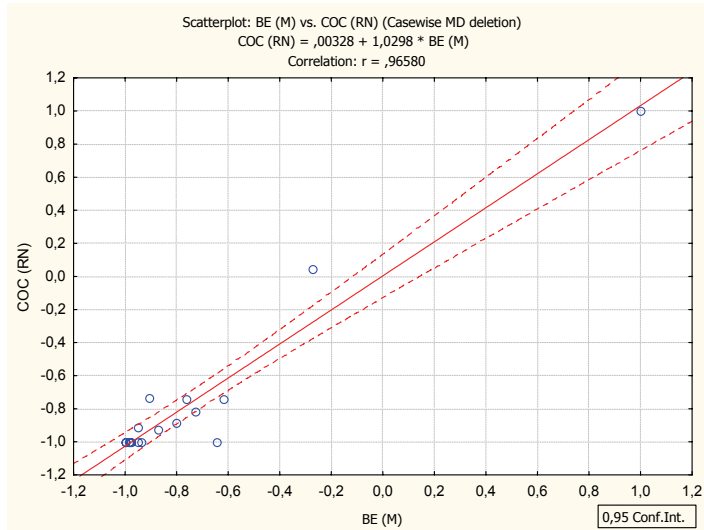
**Figura 8.7.** Correlación MOR (RN)-6-MAM (RN).

#### 8.3.1.3.2 CORRELACIÓN MADRE-RECIÉN NACIDO

El vello púbico materno y el cabello del recién nacido se correlacionan bien en la COC y en la BE. Sin embargo se observa una mejor correlación para la COC (M)-COC (RN) (0,99; Figura 8.8) y la BE (M)-COC (RN) (0,97; Figura 8.9), y correlaciones ligeramente más bajas para la COC (M)-BE (RN) (0,79; Figura 8.10) y la BE (M)-BE (RN) (0,70; Figura 8.11).



**Figura 8.8.** Correlación COC (M)-COC (RN).



**Figura 8.9.** Correlación BE (M)-COC (RN).

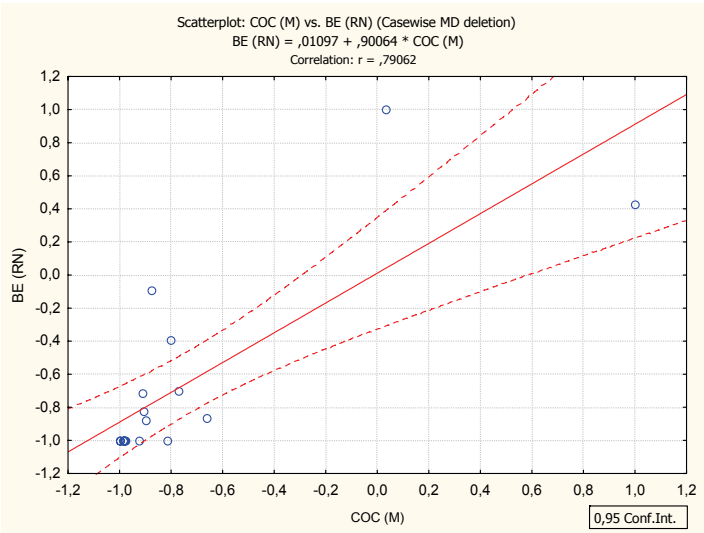


Figura 8.10. Correlación COC (M)-BE (RN).

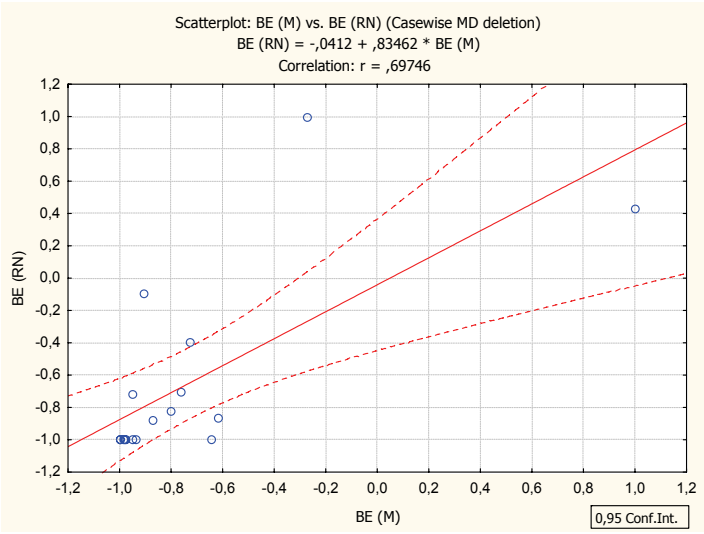
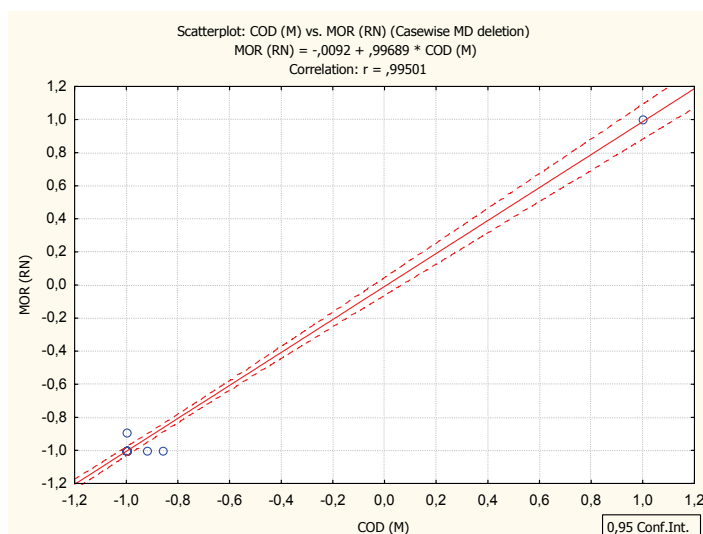


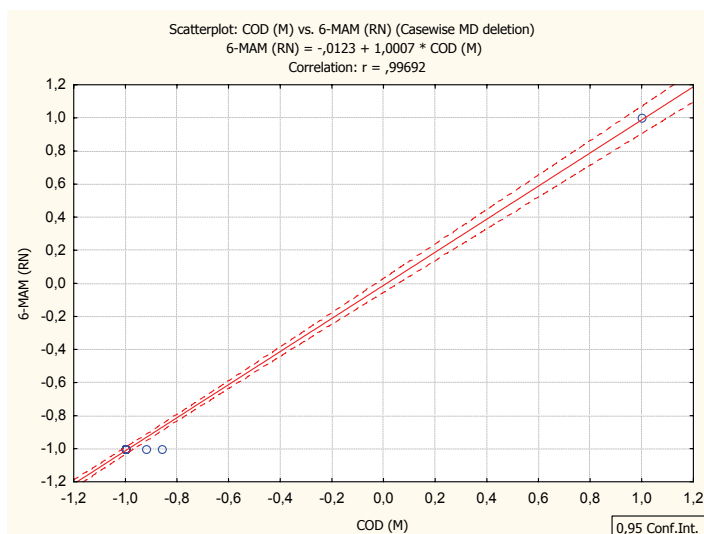
Figura 8.11. Correlación BE (M)-BE (RN).



El vello púbico materno y el cabello del recién nacido también se correlacionan bien para los tres opioides estudiados (Figuras 8.12-8.17), excepto nuevamente para la COD del recién nacido que no se correlaciona ni con la MOR ni con la 6-MAM en la madre.



**Figura 8.12.** Correlación COD (M)-MOR (RN).



**Figura 8.13.** Correlación COD (M)-6-MAM (RN).

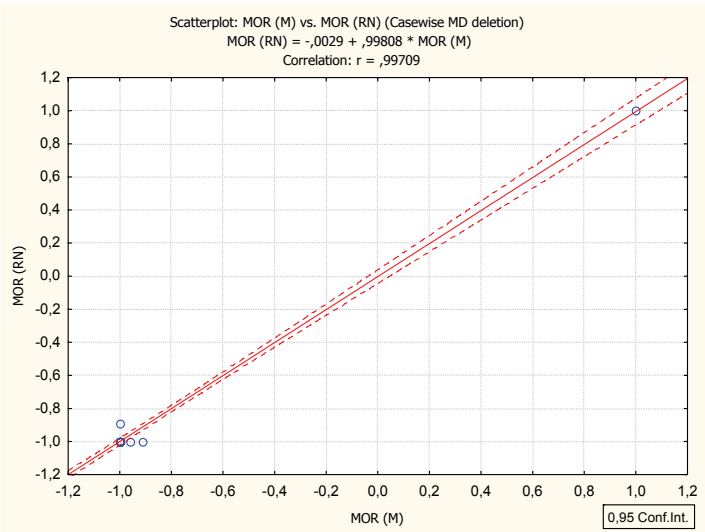


Figura 8.14. Correlación MOR (M)-MOR (RN).

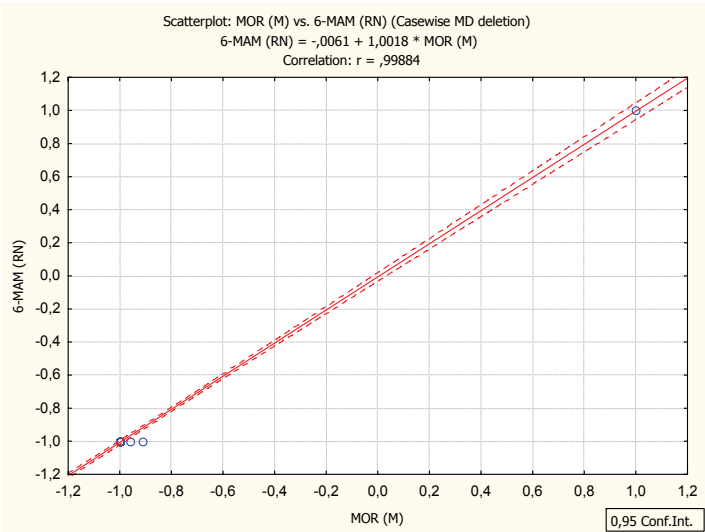
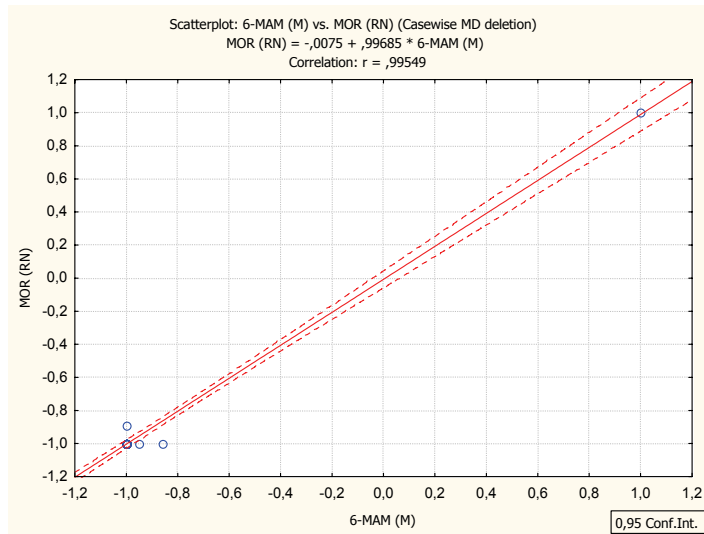
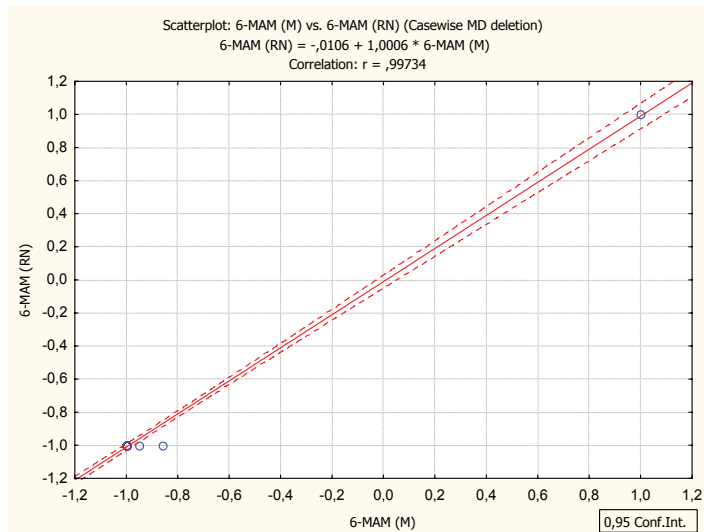


Figura 8.15. Correlación MOR (M)-6-MAM (RN).



**Figura 8.16.** Correlación 6-MAM (M)-MOR (RN).



**Figura 8.17.** Correlación 6-MAM (M)-6-MAM (RN).

8.3.2 RELACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS POSITIVOS Y NEGATIVOS EN LA MADRE Y EL RECIÉN NACIDO

Se ha establecido también una relación entre las muestras de vello púbico materno y las de cabello del recién nacido en función de si los resultados de *screening* y/o confirmación han sido positivos o negativos para cada uno de los analitos estudiados. En este caso se han incluido en el estudio todas las muestras de Obstetricia y Neonatología analizadas y se ha establecido la relación que se observa en la Tabla 8.6.

Tabla 8.6. Relación de positivos y negativos en la madre y en el recién nacido.

	M + / RN +	M - / RN -	M + / RN -	M - / RN +
COC	9/9	60/60	6/6	2/2
BE	9/9	62/62	6/6	0/0
COD	0/0	74/74	3/3	0/0
MOR	1/1	74/74	2/2	0/0
6-MAM	1/1	74/47	2/2	0/0

En la Figura 8.18 se puede observar la representación gráfica de la distribución porcentual de los cinco compuestos analizados en función de la relación de positivos y negativos en la madre y el recién nacido en la población total.

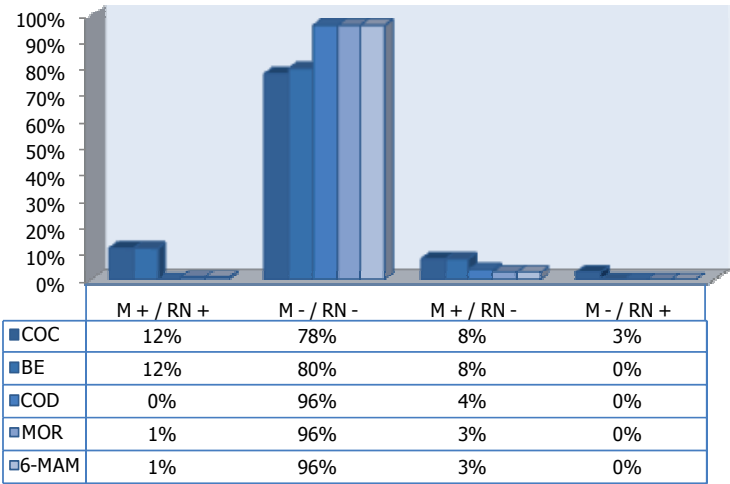
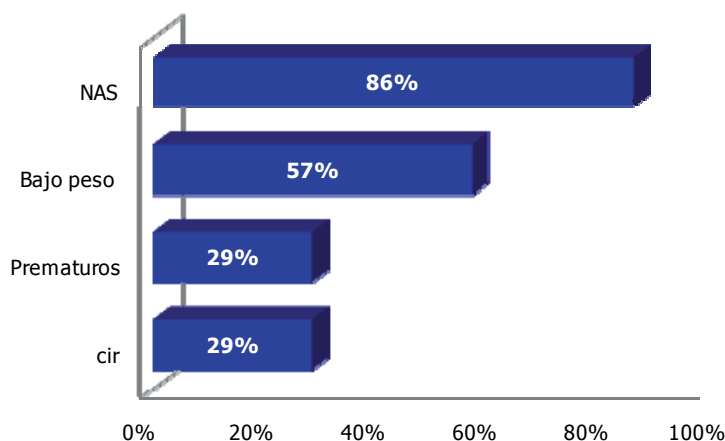


Figura 8.18. Distribución porcentual de los cinco analitos estudiados en función de la relación de positivos y negativos en la madre y el recién nacido.

### 8.3.3 RELACIÓN ENTRE EL CONSUMO MATERNO Y LAS POSIBLES ALTERACIONES EN EL RECIÉN NACIDO

En 7 recién nacidos de Neonatología se han observado alteraciones clínicas perinatales (N1-N7). La distribución porcentual de las patologías encontradas en estos 7 recién nacidos se representa en la Figura 8.19. El NAS ha sido la manifestación clínica más frecuentemente encontrada (6). Otras patologías como bajo peso al nacer (4), parto prematuro (2) y crecimiento intrauterino retardado (cir, 2) también han sido encontradas aunque en menor proporción.



**Figura 8.19.** Representación gráfica de las patologías encontradas en los 7 recién nacidos de Neonatología.

### **8.3.4 INCIDENCIA DEL CONSUMO DE COCAÍNA Y OPIOIDES EN EL EMBARAZO**

La incidencia del consumo de COC y opioides observada en este estudio para las dos poblaciones y las dos matrices analizadas se resume en la siguiente tabla.

**Tabla 8.7.** Incidencia del consumo de COC y opioides en el embarazo.

	OBSTETRICIA		NEONATOLOGÍA	
	Vello púbico	Cabello	Vello púbico	Cabello
<b>COC</b>	8%	8%	41%	29%
<b>OPIOIDES</b>	0%	0%	0%	0%
<b>COC+OPIOIDES</b>	3%	2%	6%	0%

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tabernero MJ, Bermejo AM, Fernández P. Analysis of opiates and cocaine by RIA and GC-MS: distribution of their metabolites in urine and hair from drug addicts. *Addict Biol* 4(4) (1999) 421-428.
2. Bermejo-Barrera P, Moreda-Piñeiro A, Bermejo-Barrera A, Bermejo-Barrera AM. Application of multivariate methods to scalp hair metal data to distinguish between drug-free subjects and drug abusers. *Anal Chim Acta* 455(2) (2002) 253-265.





# Capítulo

# 9

## Experimental: Determinación de cocaína y opioides en meconio por GC-MS



## Capítulo 9. Experimental: Determinación de cocaína y opioides en meconio por GC-MS

9.1	EXTRACCIÓN CON WATERS OASIS® HLB .....	233
9.1.1	MATERIAL Y MÉTODOS .....	233
9.1.1.1	INSTRUMENTACIÓN.....	233
9.1.1.1.1	INSTRUMENTACIÓN PARA LA PREPARACIÓN Y EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA.....	233
9.1.1.1.2	INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA.....	234
9.1.1.1.2.1	CROMATÓGRAFO DE GASES .....	234
9.1.1.1.2.2	ESPECTRÓMETRO DE MASAS.....	234
9.1.1.1.2.3	SOPORTE INFORMÁTICO .....	234
9.1.1.2	MATERIAL DE LABORATORIO .....	234
9.1.1.3	REACTIVOS .....	235
9.1.1.4	PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES.....	236
9.1.1.4.1	PREPARACIÓN DE TAMPONES Y SOLUCIONES .....	236
9.1.1.4.2	PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES MADRE.....	236
9.1.1.4.3	PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES DE TRABAJO .....	236
9.1.1.5	CONDICIONES DEL CROMATÓGRAFO DE GASES .....	237
9.1.1.6	CONDICIONES DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS.....	237
9.1.1.7	RECOGIDA Y RECEPCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	238
9.1.1.8	TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS .....	238
9.1.1.8.1	PREPARACIÓN.....	238
9.1.1.8.2	PROCESO DE EXTRACCIÓN .....	238
9.1.1.8.3	DERIVATIZACIÓN .....	239
9.1.1.9	VALIDACIÓN DEL MÉTODO .....	239
9.1.1.9.1	SELECTIVIDAD .....	239
9.1.1.9.2	MODELO DE CALIBRACIÓN (LINEALIDAD) .....	239
9.1.1.9.3	LÍMITES.....	240
9.1.1.9.4	PRECISIÓN .....	240
9.1.1.9.5	EXACTITUD.....	240
9.1.1.9.6	RENDIMIENTO .....	240

9.1.1.10	APLICACIÓN A CASOS REALES.....	241
9.1.2	RESULTADOS .....	241
9.1.2.1	CONDICIONES DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS .....	241
9.1.2.2	SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA .....	242
9.1.2.3	RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN .....	243
9.1.2.3.1	SELECTIVIDAD .....	243
9.1.2.3.2	LINEALIDAD, LÍMITES, PRECISIÓN, EXACTITUD Y RENDIMIENTO... ..	244
9.1.2.4	APLICACIÓN A CASOS REALES.....	247
9.2	EXTRACCIÓN CON BOND ELUT CERTIFY® .....	247
9.2.1	MATERIAL Y MÉTODOS.....	247
9.2.1.1	INSTRUMENTACIÓN .....	247
9.2.1.1.1	INSTRUMENTACIÓN PARA LA PREPARACIÓN Y EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA .....	247
9.2.1.1.2	INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA .....	248
9.2.1.1.2.1	CROMATÓGRAFO DE GASES.....	248
9.2.1.1.2.2	ESPECTRÓMETRO DE MASAS .....	248
9.2.1.1.2.3	SOPORTE INFORMÁTICO .....	248
9.2.1.2	MATERIAL DE LABORATORIO .....	249
9.2.1.3	REACTIVOS.....	249
9.2.1.4	PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES .....	250
9.2.1.4.1	PREPARACIÓN DE TAMPONES Y SOLUCIONES.....	250
9.2.1.4.2	PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES MADRE .....	251
9.2.1.4.3	PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES DE TRABAJO .....	251
9.2.1.5	CONDICIONES DEL CROMATÓGRAFO DE GASES Y DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS .....	251
9.2.1.6	RECOGIDA Y RECEPCIÓN DE LAS MUESTRAS .....	252
9.2.1.7	TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	252
9.2.1.7.1	PREPARACIÓN .....	252
9.2.1.7.2	PROCESO DE EXTRACCIÓN .....	252
9.2.1.7.3	DERIVATIZACIÓN .....	253
9.2.1.8	VALIDACIÓN DEL MÉTODO .....	253
9.2.1.8.1	SELECTIVIDAD .....	253

9.2.1.8.2	MODELO DE CALIBRACIÓN (LINEALIDAD) .....	253
9.2.1.8.3	LÍMITES .....	254
9.2.1.8.4	PRECISIÓN .....	254
9.2.1.8.5	EXACTITUD .....	254
9.2.1.8.6	RENDIMIENTO .....	254
9.2.1.9	APLICACIÓN A CASOS REALES .....	255
9.2.2	RESULTADOS.....	255
9.2.2.1	CONDICIONES DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS.....	255
9.2.2.2	SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA .....	256
9.2.2.3	RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN.....	257
9.2.2.3.1	SELECTIVIDAD .....	257
9.2.2.3.2	LINEALIDAD, LÍMITES, PRECISIÓN, EXACTITUD Y RENDIMIENTO.....	258
9.2.2.4	APLICACIÓN A CASOS REALES .....	260
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	262



## 9.1 EXTRACCIÓN CON WATERS OASIS® HLB

El trabajo que a continuación se detalla ha sido publicado<sup>1</sup> y dicha publicación se anexa al final de este capítulo.

### 9.1.1 MATERIAL Y MÉTODOS

#### 9.1.1.1 INSTRUMENTACIÓN

##### 9.1.1.1.1 INSTRUMENTACIÓN PARA LA PREPARACIÓN Y EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA

- ✓ Balanza analítica digital *BP61S* (*Sartorius*®).
- ✓ Vórtex Reax 2000 (*Heidolph*®).
- ✓ Centrífuga de sobremesa analógica *Mixtasel* (*Selecta*®).
- ✓ Pipetas automáticas (*Gilson*® y *Eppendorf*®).
- ✓ pHmetro digital Basic 20 (*Crison*®)
- ✓ Agitador magnético HI 190M (*Hamma Instruments*®)
- ✓ Sistema de purificación del agua Milli-Q (*Millipore*®).
- ✓ Sistema manual de extracción en fase sólida Visiprep™ DL (*Supelco*®).
- ✓ Termostato de bloque metálico para 24 tubos con suministro múltiple de nitrógeno VLM EC1 (*VLM*).
- ✓ Baño de ultrasonidos (*Selecta*®).

#### 9.1.1.1.2 INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA

##### 9.1.1.1.2.1 CROMATÓGRAFO DE GASES

El sistema cromatográfico empleado ha sido un cromatógrafo de gases HP 6890 Series (Hewlett-Packard®). Como columna cromatográfica se ha utilizado una columna capilar HP-5 (30 m x 250 µm x 0,25 µm) (Agilent®).

##### 9.1.1.1.2.2 ESPECTRÓMETRO DE MASAS

El espectrómetro de masas empleado ha sido un *HP 5973 Inert* (Hewlett-Packard®).

##### 9.1.1.1.2.3 SOPORTE INFORMÁTICO

Se ha utilizado un ordenador *HP Compaq d530 SFF* (Hewlett-Packard®) con sistema operativo Windows XP. El software de manejo y comunicación del sistema ha sido el ChemStation Versión G1701DA.

#### 9.1.1.2 MATERIAL DE LABORATORIO

- ✓ Botes de cristal ámbar de 8 mL para el almacenamiento de disoluciones patrón.
- ✓ Matraces aforados.
- ✓ Probetas.
- ✓ Vasos de precipitados.
- ✓ Pipetas Pasteur.
- ✓ Vidrios de reloj.
- ✓ Tubos Pyrex® redondos.
- ✓ Tubos Pyrex® cónicos.
- ✓ Columnas de extracción Waters Oasis® HLB 3cc (60 mg).



- ✓ Frascos lavadores.
- ✓ Espátulas.
- ✓ Gradillas.
- ✓ Jeringa de inyección de 10 µL (*Hewlett-Packard®*).

### **9.1.1.3 REACTIVOS**

- ✓ Agua Milli-Q.
- ✓ Acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) de grado gradiente (*Merck®*).
- ✓ Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) de grado gradiente (*Merck®*).
- ✓ Ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) para análisis (*Merck®*).
- ✓ Cloruro potásico (KCl) para análisis (*Merck®*).
- ✓ Hidróxido sódico (NaOH) en lentejas para análisis (*Merck®*).
- ✓ Hidróxido amónico ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) 25% para análisis (*Merck®*).
- ✓ Ácido acético glacial ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) 100% para análisis (*Merck®*).
- ✓ Clorotrimetilsilano (TMCS,  $\text{C}_3\text{H}_9\text{ClSi}$ ) para cromatografía de gases (*Merck®*).
- ✓ N,O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA,  $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{F}_3\text{NOSi}$ ) (*Sigma-Aldrich®*).
- ✓ COC, BE, COD, MOR y 6-MAM en forma sólida (*Lipomed®*).
- ✓ COC-d<sub>3</sub>, BE-d<sub>3</sub>, COD-d<sub>3</sub>, MOR-d<sub>3</sub> y 6-MAM-d<sub>3</sub> en disolución, 100 µg/mL (*Cerilliant®*).

#### **9.1.1.4 PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES**

##### **9.1.1.4.1 PREPARACIÓN DE TAMPONES Y SOLUCIONES**

- ✓ Tampón borato, pH 9: Se pesaron 6,2 g de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  y 7,5 g de KCl. En un matraz aforado de 1 L se añadieron los dos sólidos y 420 mL de NaOH 0,1 M, (2 g de NaOH en 500 mL de agua) enrasando hasta 1 L con agua Milli-Q. Se comprobó el pH y cuando fue necesario se ajustó con NaOH o HCl diluidos.
- ✓ Agua:metanol (95:5, v/v): Se midieron 25 mL de metanol y se enrasaron con agua en un matraz aforado de 500 mL.
- ✓ Agua:metanol: $\text{NH}_4\text{OH}$  (80:18:2, v/v/v): Se midieron 1 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  y 9 mL de metanol y se enrasaron con agua en un matraz de 50 mL.
- ✓ Metanol:ácido acético (98:2, v/v): Se midieron 10 mL de ácido acético y se enrasaron con metanol en un matraz de 500 mL.
- ✓ BSTFA-TMCS (99:1, v/v): La disolución de derivatizante se preparó diariamente tomando 99 partes de BSTFA y 1 parte de TMCS.

##### **9.1.1.4.2 PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES MADRE**

A partir de las sustancias patrón en estado sólido se prepararon las denominadas disoluciones madre. En la balanza analítica se pesaron 5 mg del patrón y se disolvieron en 5 mL de metanol, excepto para la COC y la 6-MAM que se disolvieron en acetonitrilo, resultando así una disolución madre de 1 mg/mL. Estas disoluciones fueron almacenadas a 4°C y protegidas de la luz.

##### **9.1.1.4.3 PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES DE TRABAJO**

Las disoluciones de trabajo se realizaron a partir de las disoluciones madre o de las ampollas comerciales diluyéndolas en metanol. Se realizaron disoluciones separadas de los compuestos sin deuterar a distintas concentraciones, que serían utilizadas para la elaboración de las rectas de calibrado, y por otro lado de los deuterados, que serían utilizados como PI.

Las disoluciones de trabajo han sido preparadas a 0,8; 2, 5 y 10 µg/ml. La disolución de los PI fue una mezcla de COC-d<sub>3</sub>, BE-d<sub>3</sub>, COD-d<sub>3</sub>, MOR-d<sub>3</sub> y 6-MAM-d<sub>3</sub> a 10 µg/ml.

#### 9.1.1.5 CONDICIONES DEL CROMATÓGRAFO DE GASES

La separación cromatográfica ha sido realizada, tal como se ha indicado antes, empleando una columna capilar HP-5 (30 m x 250 µm x 0,25 µm). Como gas portador se ha utilizado helio, con un flujo de 1,0 mL/min. La temperatura del inyector ha sido de 240°C, con un tiempo de purga de 2 minutos. Las inyecciones se han efectuado manualmente en modo *splitless*. El volumen de inyección empleado fue de 1 µL. La temperatura de la columna se ha programado inicialmente a 90°C durante 1 minuto. La primera rampa ha sido de 30°C/min hasta llegar a los 190°C, donde se mantuvo 1 minuto. A continuación una segunda rampa de 8°C/min hasta 260°C, manteniéndose 4 minutos. El análisis se ha realizado en un tiempo total de 18 min. Finalizado éste, la columna se mantuvo a una temperatura de 290°C durante 10 minutos para favorecer su limpieza (Figura 9.1).

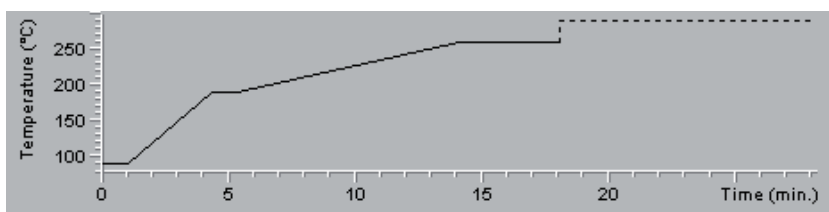


Figura 9.1. Programa de temperaturas.

#### 9.1.1.6 CONDICIONES DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS

Las temperaturas de la fuente de ionización, el analizador cuadrupolar y el detector han sido, respectivamente, 250°C, 100°C y 300°C, provocando la ionización de las moléculas mediante impacto electrónico con una energía de 70 eV. El rango de masas elegido fue 50-550, con una velocidad de barrido de 1,5 scans/s y un tiempo de parada en cada masa (*dwell time*) de 0,1 s.

### **9.1.1.7 RECOGIDA Y RECEPCIÓN DE LAS MUESTRAS**

Muestras blanco de meconio, necesarias para la realización de la validación del método analítico, han sido obtenidas de 8 bebés nacidos en el Hospital Clínico de Santiago de Compostela de los que se tenía absoluta certeza de que no habían sido expuestos a drogas durante el embarazo. La aplicabilidad del método se ha realizado en 30 muestras de meconio, también procedentes del Hospital Clínico y remitidas al Servicio de Toxicología del IUML de Santiago tras observarse una sospecha clínica de consumo de drogas durante el embarazo.

Todas estas muestras correspondían al primer meconio obtenido del pañal del recién nacido durante las primeras 24 horas de vida de éste. La recogida de las mismas ha sido realizada por personal del hospital. Para su traslado al laboratorio las muestras han sido depositadas en botes plásticos e éstos introducidos en neveras. Una vez en el laboratorio, las muestras han sido adecuadamente identificadas y almacenadas a una temperatura de -20°C hasta su análisis.

### **9.1.1.8 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

#### **9.1.1.8.1 PREPARACIÓN**

Las muestras de meconio han requerido una etapa de preparación previa a la extracción. Ésta ha sido realizada a partir de 0,5 g de meconio al que se le han añadido el PI (50 µL 10 µg/mL) y 3 mL de metanol. A continuación la mezcla fue agitada durante 20 minutos y centrifugada a 2000 rpm durante 10 minutos más. Finalmente la fase orgánica ha sido transferida a un tubo cónico y el disolvente evaporado a seco a 40°C bajo una corriente de nitrógeno.

#### **9.1.1.8.2 PROCESO DE EXTRACCIÓN**

El residuo seco fue a continuación disuelto en 1 mL de tampón borato (pH 9) y sometido al mismo proceso de SPE que el empleando para las muestras de pelo (véase apartado 7.1.8.3).

#### 9.1.1.8.3 DERIVATIZACIÓN

Los extractos fueron evaporados a seco a 40°C bajo una suave corriente de nitrógeno y el extracto seco fue derivatizado empleado el mismo procedimiento que en las muestras de pelo (40 µL BSTFA-TMCS (99:1, v/v), 100°C, 20 min). Después de enfriar la muestra a temperatura ambiente, 1 µL de ésta ha sido inyectada manualmente en el sistema cromatográfico.

#### 9.1.1.9 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

La validación de este método ha sido realizada en base a los criterios establecidos por la FDA, la ICH y algunas revisiones, tal como se ha explicado en la validación del método del Capítulo 7.

Los parámetros de validación estudiados han sido los que a continuación se indican.

##### 9.1.1.9.1 SELECTIVIDAD

La evaluación de la selectividad se realizó analizando el meconio de ocho recién nacidos de los que se tenía absoluta certeza de que no habían sido expuestos a drogas de abuso durante el embarazo (muestras blanco).

##### 9.1.1.9.2 MODELO DE CALIBRACIÓN (LINEALIDAD)

El modelo de calibración elegido ha sido el de mínimos cuadrados, elección basada en un examen visual de la curva de calibrado y un estudio de las residuales obtenidas aplicando el modelo.

El estudio de la linealidad ha sido realizado preparando controles de calibrado con muestras blanco de meconio con concentraciones de 40, 200, 400, 1000, 1500 y 2000 ng/g (Tabla 9.1), las cuales fueron sometidas al proceso de tratamiento de muestra previamente descrito. Para cada concentración, seis controles de calibrado han sido preparados en días diferentes.

**Tabla 9.1.** Preparación de los controles de calibrado.

	40 ng/g	200 ng/g	400 ng/g	1000 ng/g	1500 ng/g	2000 ng/g
SOL. 0,8 µg/ml	25 µl	-	-	-	-	-
SOL. 2 µg/ml	-	50 µl	100 µl	-	-	-
SOL. 5 µg/ml	-	-	-	-	150 µl	-
SOL. 10 µg/ml	-	-	-	50 µl	-	100 µl
PI 10 µg/ml	-	-	-	50 µl	-	-

#### 9.1.1.9.3 LÍMITES

El cálculo del LOD, LLOQ y el ULOQ ha sido realizado empíricamente analizando 5 replicados de muestras blanco de meconio con concentraciones decrecientes de los analitos de interés.

#### 9.1.1.9.4 PRECISIÓN

En el cálculo de la precisión se analizaron 5 replicados de una concentración el mismo día de análisis (precisión intradía) o en días distintos (precisión interdía). Se ha estudiado la precisión a tres niveles de concentración diferentes (LLOQ, ULOQ y un punto intermedio de la recta de calibración).

#### 9.1.1.9.5 EXACTITUD

En el cálculo de la exactitud se analizaron 5 replicados de una concentración el mismo día de análisis (exactitud intradía) o en días distintos (exactitud interdía) para tres niveles de concentración (LLOQ, ULOQ y un punto intermedio de la recta de calibración).

#### 9.1.1.9.6 RENDIMIENTO

En el cálculo del rendimiento se utilizaron 4 replicados para dos niveles de concentración (punto bajo y alto de la recta de calibración).

### 9.1.1.10 APLICACIÓN A CASOS REALES

El método desarrollado ha sido aplicado a 30 muestras de meconio procedentes del Servicio de Neonatología del Hospital Clínico de Santiago de Compostela y remitidas al Servicio de Toxicología del IUML de Santiago tras observarse una sospecha clínica de consumo de drogas durante el embarazo.

La cuantificación de estas muestras se realizó con rectas de calibrado extraídas e inyectadas el mismo día que las muestras correspondientes. En el caso de muestras a concentraciones superiores al ULOQ, éstas fueron diluidas convenientemente y nuevamente analizadas.

## 9.1.2 RESULTADOS

### 9.1.2.1 CONDICIONES DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS

La selección de iones para cada uno de los compuestos estudiados así como sus tiempos de retención y sus ventanas de detección se recogen en la siguiente tabla.

**Tabla 9.2.** Selección de iones monitorizados para cada uno de los compuestos con sus ventanas de detección y sus respectivos tiempos de retención.

Compuesto	Ventana de detección (min)	m/z seleccionadas*	tr (min)
COC	12,3-13,0	182, 198, <b>303</b>	12,6
COC-d <sub>3</sub>		185, 201, <b>306</b>	
BE-TMS	13,0-14,5	<b>240</b> , 361	13,2
BE-TMS-d <sub>3</sub>		<b>243</b> , 364	
COD-TMS	14,5-15,5	<b>178</b> , 234, 371	15,2
COD-TMS-d <sub>3</sub>		<b>181</b> , 237, 374	
MOR-2TMS	15,5-16,2	236, <b>414</b> , 429	15,7
MOR-2TMS-d <sub>3</sub>		239, <b>417</b> , 432	
6-MAM-TMS	16,2-18,1	287, <b>340</b> , 399	16,6
6-MAM-TMS-d <sub>3</sub>		290, <b>343</b> , 402	

\*El ión de cuantificación figura en negrita.

Estos parámetros son prácticamente iguales que los del método descrito en el Capítulo 7 (véase Tabla 7.2). Existen pequeñas variaciones, por ejemplo en la ventana de detección de la COC y su respectivo derivado deuterado, que en el caso del meconio se

abre más tarde debido a que entre los 11,6 minutos (inicio de la ventana de detección de la COC en el método del pelo) y los 12,3 (inicio de la ventana en el caso del meconio) se observaban muchas interferencias en los cromatogramas que dificultaban el posterior análisis de los compuestos de interés.

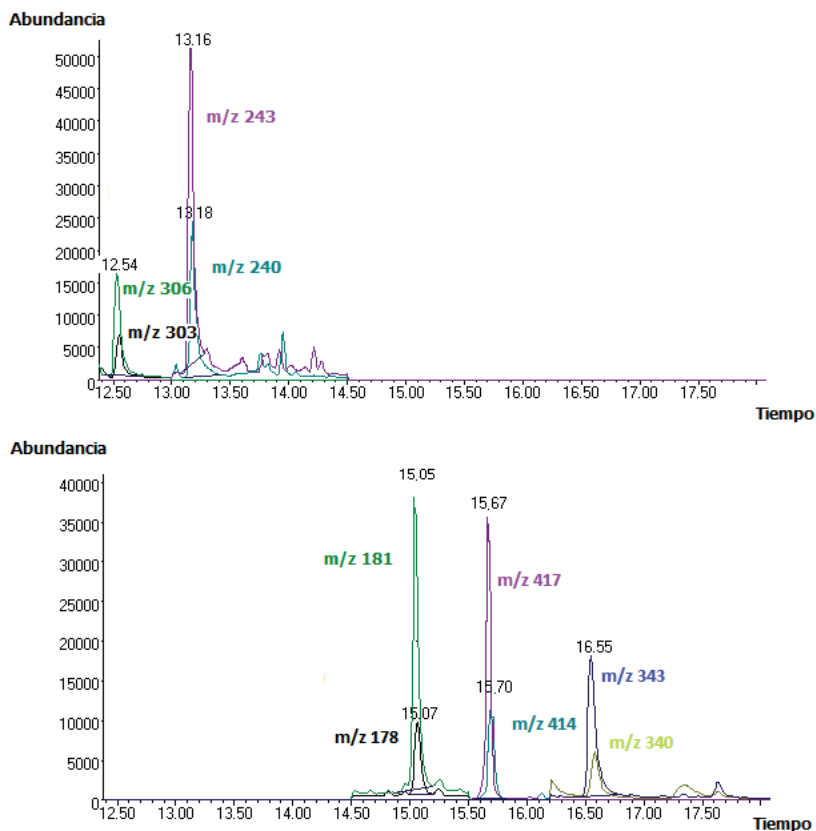
El criterio de selección de iones ha sido el mismo que el empleado en el caso de las muestras de pelo, sin embargo, para la mayoría de los analitos no se ha seleccionado como ión cuantificador el ión mayoritario debido a que este ión proporcionaba cromatogramas con muchas interferencias en las respectivas ventanas de detección de los analitos de interés, por lo que se optó por substituirlos por otros que causaran menos interferencias en el cromatograma.

#### **9.1.2.2 SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA**

La separación cromatográfica fue realizada en las condiciones descritas en el apartado correspondiente de Material y Métodos. A través del programa cromatográfico empleado la separación de los compuestos se logró en menos de 17 minutos.

En la Figura 9.2 se muestra el cromatograma en modo SIM del ión de cuantificación de cada uno de los compuestos analizados y sus respectivos derivados deuterados en una muestra blanco de meconio preparada a 400 ng/g. Como se puede observar, ninguno de los compuestos estudiados se solapa en el tiempo, por lo tanto la separación es completa (Resolución > 1).



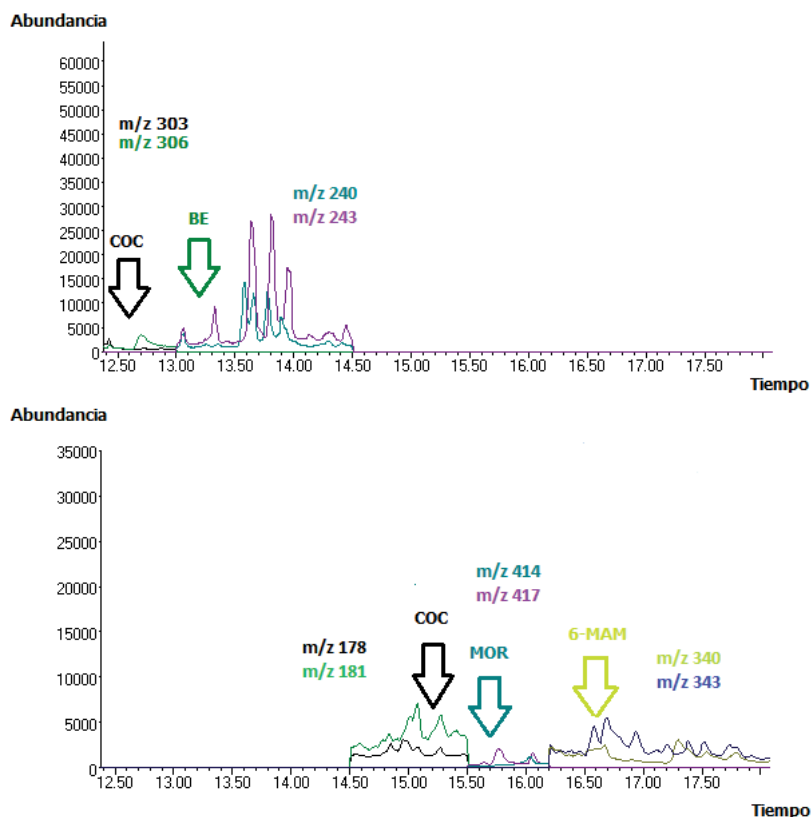


**Figura 9.2.** Cromatograma en modo SIM del ión de cuantificación de cada uno de los compuestos estudiados y sus respectivos derivados deuterados en una muestra blanco de meconio preparada a 400 ng/g.

### 9.1.2.3 RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN

#### 9.1.2.3.1 SELECTIVIDAD

En las ocho muestras blanco de meconio analizadas se comprobó que no existían interferencias con los analitos de interés, tanto para el ión de cuantificación como para el ión/iones de confirmación. La Figura 9.3 muestra el cromatograma en modo SIM de los iones de cuantificación de los compuestos analizados y sus respectivos derivados deuterados en una de las muestras blanco de meconio.



**Figura 9.3.** Cromatograma en modo SIM de los iones de cuantificación de los compuestos analizados y sus respectivos derivados deuterados en una muestra blanco de meconio.

#### 9.1.2.3.2 LINEALIDAD, LÍMITES, PRECISIÓN, EXACTITUD Y RENDIMIENTO

La linealidad de la relación de áreas compuesto/PI frente a la concentración teórica fue verificada en el método propuesto usando el modelo de mínimos cuadrados. Los coeficientes de regresión ( $r^2$ ) fueron superiores a 0,99 en todos los casos.

El LOD observado para la COC, BE y COD fue de 30 ng/g, mientras que para la MOR y la 6-MAM fue de 20 ng/g. El LLOQ y el ULOQ, que se corresponden respectivamente con el valor inferior y superior de la recta de calibrado, fueron 40 y 2000 ng/g para todos los compuestos.

La precisión (intradía e interdía) expresada como CV y la exactitud (intradía e interdía) expresada como MRE, estudiadas ambas para el LLOQ (40 ng/g), el ULOQ (2000 ng/g) y para un punto intermedio de la recta de calibrado (1000 ng/g), fueron menores del 15%, o del 20% en el caso del LLOQ, para todos los compuestos estudiados.

El rendimiento del proceso de extracción calculado a dos valores de concentración intermedios (400 y 1000 ng/g), fue en todos los casos superior al 40%, variando éste entre el 44,19 y 85,57%.

Los parámetros de validación obtenidos para cada uno de los compuestos han sido recogidos en la siguiente tabla.

**Tabla 9.3.** Principales parámetros de validación del método.

	Conc ng/g	LOD ng/g	LOQ ng/g		Precisión y exactitud intradía (%)		Precisión y exactitud interdía (%)		R (%)	
			LLOQ	ULOQ	CV	MRE	CV	MRE		
COC	40	30	40	2000	18,28	7,000	15,75	9,318	53,91	
	400									
	1000				7,539	3,640	10,47	9,115		68,48
	2000				2,510	2,620	4,194	1,772		
Curva de calibración (n=6): A=0, B=0,00102±0,00004, r²=0,997±0,003										
BE	40	30	40	2000	8,177	14,79	12,62	19,89	44,19	
	400									
	1000				4,781	11,16	5,815	5,832		61,08
	2000				11,12	1,775	4,484	1,458		
Curva de calibración (n=6): A=0, B=0,00118±0,00004, r²=0,993±0,004										
COD	40	30	40	2000	19,57	0,500	9,898	16,83	65,11	
	400									
	1000				8,682	3,560	9,601	0,787		80,73
	2000				7,633	4,883	5,188	5,840		
Curva de calibración (n=6): A=0, B=0,0005±0,0001, r²=0,993±0,004										
MOR	40	20	40	2000	3,331	18,91	6,689	13,13	54,24	
	400									
	1000				5,156	2,520	3,874	3,617		54,10
	2000				3,086	3,312	5,753	1,612		
Curva de calibración (n=6): A=0, B=0,0016±0,0001, r²=0,993±0,006										
6-MAM	40	20	40	2000	7,032	18,57	14,04	22,59	62,25	
	400									
	1000				9,024	2,575	12,19	6,214		87,57
	2000				1,243	3,475	3,561	0,613		
Curva de calibración (n=6): A=0, B=0,0008±0,0001, r²=0,995±0,003										

#### 9.1.2.4 APLICACIÓN A CASOS REALES

Los resultados de GC-MS obtenidos para las 10 muestras de meconio positivas se muestran en la Tabla 9.4.

**Tabla 9.4.** Resultados GC-MS de las 10 muestras de meconio positivas.

Muestra	Concentración (ng/g)				
	COC	BE	COD	MOR	6-MAM
1	985,9	780,4	-	-	-
2	785,4	572,9	154,3	325,7	232,4
3	754,3	452,5	-	-	-
4	525,3	321,4	600,4	825,3	1350
5	639,8	216,0	-	-	-
6	1259	954,8	235,7	125,6	264,6
7	743,9	864,0	-	-	-
8	1864	1594	124,7	214,3	893,3
9	45,38	50,12	-	-	-
10	227,0	126,4	60,95	124,9	100,9

De las 30 muestras analizadas, la COC y la BE en solitario han sido detectadas en 5 casos (17%) y asociadas a los opioides de estudio en otros 5 casos (17%).

## 9.2 EXTRACCIÓN CON BOND ELUT CERTIFY®

El trabajo que a continuación se detalla ha sido publicado<sup>2</sup> y dicha publicación se anexa al final de este capítulo.

### 9.2.1 MATERIAL Y MÉTODOS

#### 9.2.1.1 INSTRUMENTACIÓN

##### 9.2.1.1.1 INSTRUMENTACIÓN PARA LA PREPARACIÓN Y EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA

- ✓ Balanza analítica digital *BP61S* (*Sartorius®*).
- ✓ Vórtex Reax 2000 (*Heidolph®*).
- ✓ Centrífuga de sobremesa analógica *Mixtasel* (*Selecta®*).

- ✓ Pipetas automáticas (*Gilson<sup>®</sup>* y *Eppendorf<sup>®</sup>*).
- ✓ pHmetro digital Basic 20 (*Crison<sup>®</sup>*)
- ✓ Agitador magnético HI 190M (*Hamma Instruments<sup>®</sup>*)
- ✓ Sistema de purificación del agua Milli-Q (*Millipore<sup>®</sup>*).
- ✓ Sistema manual de SPE VisiprepTM DL (*Supelco<sup>®</sup>*).
- ✓ Termostato de bloque metálico para 24 tubos con suministro múltiple de nitrógeno VLM EC1 (*VLM*).
- ✓ Baño de ultrasonidos (*Selecta<sup>®</sup>*).

#### 9.2.1.1.2 INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA

##### 9.2.1.1.2.1 CROMATÓGRAFO DE GASES

El sistema cromatográfico empleado ha sido un cromatógrafo de gases HP 6890 Series (*Hewlett-Packard<sup>®</sup>*). Como columna cromatográfica se ha utilizado una columna capilar HP-5 (30 m x 250  $\mu\text{m}$  x 0,25  $\mu\text{m}$ ) (*Agilent<sup>®</sup>*). La inyección de las muestras se ha realizado con un inyector automático *HP 7683B Series* (*Agilent<sup>®</sup>*).

##### 9.2.1.1.2.2 ESPECTRÓMETRO DE MASAS

El espectrómetro de masas empleado ha sido un *HP 5973 Inert* (*Hewlett-Packard<sup>®</sup>*).

##### 9.2.1.1.2.3 SOPORTE INFORMÁTICO

Se ha utilizado un ordenador un ordenador *HP Compaq d530 SFF* (*Hewlett-Packard<sup>®</sup>*) con sistema operativo Windows XP. El software de manejo y comunicación del sistema ha sido el ChemStation Versión G1701DA.

### **9.2.1.2 MATERIAL DE LABORATORIO**

- ✓ Botes de cristal ámbar de 8 mL para el almacenamiento de disoluciones patrón.
- ✓ Matraces aforados.
- ✓ Probetas.
- ✓ Vasos de precipitados.
- ✓ Pipetas Pasteur.
- ✓ Vidrios de reloj.
- ✓ Tubos Pyrex<sup>®</sup> redondos.
- ✓ Tubos Pyrex<sup>®</sup> cónicos.
- ✓ Columnas de extracción Bond Elut<sup>®</sup> Certify 3 mL (130 mg).
- ✓ Frascos lavadores.
- ✓ Espátulas.
- ✓ Gradillas.
- ✓ Jeringa de inyección de 10 µL (*Hewlett-Packard*<sup>®</sup>).

### **9.2.1.3 REACTIVOS**

- ✓ Agua Milli-Q.
- ✓ Acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) de grado gradiente (*Merck*<sup>®</sup>).
- ✓ Metanol (CH<sub>3</sub>OH) de grado gradiente (*Merck*<sup>®</sup>).
- ✓ Fosfato potásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) para análisis (*Merck*<sup>®</sup>).

- ✓ Fosfato bisódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Merck®).
- ✓ Acetato sódico anhidro ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$ ) para análisis (Merck®).
- ✓ Ácido acético glacial ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) 100% para análisis (Merck®).
- ✓ Acetato de etilo ( $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ ) para cromatografía líquida (Merck®).
- ✓ n-Hexano ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ) para cromatografía líquida (Merck®).
- ✓ Diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) para cromatografía líquida (Merck®).
- ✓ 2-propanol ( $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ ) grado gradiente (Merck®).
- ✓ Hidróxido amónico ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) 25% para análisis (Merck®).
- ✓ Clorotrimetilsilano (TMCS,  $\text{C}_3\text{H}_9\text{ClSi}$ ) para cromatografía de gases (Merck®).
- ✓ N,O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA,  $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{F}_3\text{NOSi}$ ) (Sigma-Aldrich®).
- ✓ COC, BE, COD, MOR y 6-MAM en forma sólida (Lipomed®).
- ✓ COC-d<sub>3</sub>, BE-d<sub>3</sub>, COD-d<sub>3</sub>, MOR-d<sub>3</sub> y 6-MAM-d<sub>3</sub> en disolución, 100 µg/mL (Cerilliant®).

#### **9.2.1.4 PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES**

##### **9.2.1.4.1 PREPARACIÓN DE TAMPONES Y SOLUCIONES**

- ✓ Tampón fosfato, pH 6: Se disolvieron, por una parte, 9,073 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 1 L de agua, y por otra, 9,464 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  en 1 L de agua. A continuación se tomaron 889 mL de la primera disolución y se mezclaron con 111 mL de la segunda.
- ✓ Tampón acetato sódico, pH 4: Se disolvieron, por una parte, 8,024 g de  $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$  en 1 L de agua, y por otra, se diluyeron 5,72 mL de ácido acético en 1 L de agua. A continuación se tomaron 166 mL de la primera disolución y 834 mL de la segunda.



- ✓ Acetato etilo-hexano (1:1, v/v): se midieron cantidades iguales de acetato de etilo y hexano.
- ✓ Diclorometano:2-propanol:NH<sub>4</sub>OH (78:20:2, v/v/v): Se midieron 1 mL NH<sub>4</sub>OH y 20 mL de 2-propanol y se enrasaron en un matraz de 50 mL con diclorometano.
- ✓ BSTFA-TMCS (99:1, v/v): La disolución de derivatizante ha sido preparada diariamente tomando 99 partes de BSTFA y 1 parte de TMCS.

#### 9.2.1.4.2 PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES MADRE

A partir de las sustancias patrón en estado sólido se prepararon las denominadas disoluciones madre. En la balanza analítica se pesaron 5 mg del patrón y se disolvieron en 5 mL de metanol, excepto para la COC y la 6-MAM que se disolvieron en acetonitrilo, resultando así una disolución madre de 1 mg/mL. Estas disoluciones fueron almacenadas a 4°C y protegidas de la luz.

#### 9.2.1.4.3 PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES DE TRABAJO

Las disoluciones de trabajo se realizaron a partir de las disoluciones madre o de las ampollas comerciales diluyéndolas en metanol. Se realizaron disoluciones separadas de los compuestos sin deuterar a distintas concentraciones, que serían utilizadas para la elaboración de las rectas de calibrado, y por otro lado de los deuterados, que serían utilizados como PI.

Las disoluciones de trabajo han sido preparadas a 0,2; 0,5; 2 y 5 µg/ml a partir de una disolución de 10 µg/ml. La disolución de los PI fue una mezcla de COC-d<sub>3</sub>, BE-d<sub>3</sub>, COD-d<sub>3</sub>, MOR-d<sub>3</sub> y 6-MAM-d<sub>3</sub> a 10 µg/ml.

#### **9.2.1.5 CONDICIONES DEL CROMATÓGRAFO DE GASES Y DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS**

Las condiciones cromatográficas y las del detector de masas han sido las mismas que las empleadas en el método anteriormente descrito (véanse apartados 9.1.1.5 y 9.1.1.6), exceptuando que las inyecciones han sido realizadas con el inyector automático previamente indicado en el apartado de Instrumentación Analítica.

### **9.2.1.6 RECOGIDA Y RECEPCIÓN DE LAS MUESTRAS**

Como muestras blanco se han utilizado las mismas que en el método descrito anteriormente (véase apartado 9.1.1.7). La aplicabilidad del método ha sido estudiada en un caso real de un recién nacido con síntomas de hiperexcitabilidad del Hospital Clínico de Santiago de Compostela. Después de una confirmación en el hospital de que la madre había consumido COC y opiáceos durante el embarazo, utilizando la técnica EMIT, se han remitido al Servicio de Toxicología del IUML de Santiago muestras consecutivas de orina (14, 34, 60, 80 y 103 horas post-nacimiento) y de meconio (1<sup>er</sup>, 2<sup>o</sup> y 3<sup>er</sup> día post-nacimiento) del recién nacido para observar la evolución en la distribución de la COC, BE, COD, MOR y 6-MAM durante los días siguientes al nacimiento.

Las muestras de orina y de meconio enviadas fueron convenientemente recogidas por personal del hospital y depositadas en botes plásticos para su traslado al laboratorio. El transporte se ha realizado en neveras, y una vez en el laboratorio las muestras han sido adecuadamente identificadas y almacenadas a una temperatura de -20°C hasta su análisis.

### **9.2.1.7 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

#### **9.2.1.7.1 PREPARACIÓN**

Las muestras de meconio han requerido una etapa de preparación previa a la extracción. Ésta ha sido realizada a partir de 0,5 g de meconio al que se le han añadido el PI (50 µL, 10 µg/mL) y 4 mL de metanol. A continuación la mezcla fue agitada durante 20 minutos y centrifugada a 2000 rpm durante 10 minutos más. Finalmente la fase orgánica ha sido transferida a un tubo cónico y el disolvente evaporado a seco a 40°C bajo una corriente de nitrógeno.

#### **9.2.1.7.2 PROCESO DE EXTRACCIÓN**

La extracción de COC, BE, COD, MOR y 6-MAM de las muestras de meconio fue realizada mediante un proceso de SPE con cartuchos Bond Elut® Certify 3 mL (130 mg). Estos cartuchos tienen rellenos basados en sílica C<sub>18</sub>.

El residuo seco fue disuelto en 2 mL de tampón fosfato (pH 6) y sometido al siguiente proceso de SPE. Las columnas fueron acondicionadas con 2 mL de metanol seguido de 3 mL de agua Milli-Q y 2 mL de tampón fosfato pH 6. El primer lavado fue realizado con 3 mL de agua Milli-Q, el segundo con 1 mL de tampón acetato sódico pH 4, el tercero con 3 mL de una mezcla de acetato de etilo:hexano (1:1, v/v) y por último, un lavado final con 3 mL de metanol. La elución de los analitos fue realizada con 3 mL de diclorometano:2-propanol:NH<sub>4</sub>OH (78:20:2, v/v/v).

#### 9.2.1.7.3 DERIVATIZACIÓN

Los extractos fueron evaporados a seco a 40°C bajo una suave corriente de nitrógeno y el extracto seco fue derivatizado utilizando el mismo procedimiento que en los casos anteriores (40 µL BSTFA-TMCS (99:1, v/v), 100°C, 20 min). Después de enfriar la muestra a temperatura ambiente, 1 µL de esta ha sido inyectada en el sistema cromatográfico.

#### 9.2.1.8 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

La validación de este método ha sido realizada en base a los criterios establecidos por la FDA, la ICH y algunas revisiones, tal como se ha explicado en los métodos anteriores.

Los parámetros de validación estudiados han sido los que a continuación se indican.

##### 9.2.1.8.1 SELECTIVIDAD

La evaluación de la selectividad se realizó analizando el meconio de ocho recién nacidos de los que se tenía absoluta certeza de que no habían sido expuestos a drogas de abuso durante el embarazo (muestras blanco).

##### 9.2.1.8.2 MODELO DE CALIBRACIÓN (LINEALIDAD)

El modelo de calibración elegido, igual que en los métodos anteriormente descritos, ha sido el de mínimos cuadrados, elección basada en un examen visual de la curva de calibrado y un estudio de las residuales obtenidas aplicando el modelo.

El estudio de la linealidad ha sido realizado preparando controles de calibrado con muestras blanco de meconio con concentraciones de 20, 100, 200, 500 y 1000 ng/g (Tabla 9.5), las cuales fueron sometidas al proceso de tratamiento de las muestras previamente descrito. Para cada concentración, seis controles de calibrado han sido preparados en días diferentes.

**Tabla 9.5.** Preparación de los controles de calibrado.

	20 ng/g	100 ng/g	200 ng/g	500 ng/g	1000 ng/g
SOL. 0,2 µg/ml	50 µl	-	-	-	-
SOL. 0,5 µg/ml	-	100 µl	-	-	-
SOL. 2 µg/ml	-	-	50 µl	-	-
SOL. 5 µg/ml	-	-	-	50 µl	100 µl
PI 10 µg/ml	-	-	-	-	50 µl

#### 9.2.1.8.3 LÍMITES

El cálculo del LOD, LLOQ y el ULOQ ha sido realizado empíricamente analizando 5 replicados de muestras blanco de meconio con concentraciones decrecientes de los analitos de interés.

#### 9.2.1.8.4 PRECISIÓN

En el cálculo de la precisión se analizaron 5 replicados de una concentración el mismo día de análisis (precisión intradía) o en días distintos (precisión interdía). Se ha estudiado la precisión a tres niveles de concentración diferentes (LLOQ, ULOQ y un punto intermedio de la recta de calibración).

#### 9.2.1.8.5 EXACTITUD

En el cálculo de la exactitud se analizaron 5 replicados de una concentración el mismo día de análisis (exactitud intradía) o en días distintos (exactitud interdía), para tres niveles de concentración (LLOQ, ULOQ y un punto intermedio de la recta de calibración).

#### 9.2.1.8.6 RENDIMIENTO

En el cálculo del rendimiento se utilizaron 4 replicados para dos niveles de concentración (punto bajo y alto de la recta de calibración).

### **9.2.1.9 APLICACIÓN A CASOS REALES**

El método desarrollado ha sido aplicado a 3 muestras consecutivas del meconio (1<sup>er</sup>, 2<sup>o</sup> y 3<sup>er</sup> día post-nacimiento) de un recién nacido con síntomas de hiperexcitabilidad, en cuya madre había sido confirmado el consumo de drogas mediante la técnica EMIT en el propio hospital.

La cuantificación de estas muestras se realizó con rectas de calibrado extraídas e inyectadas el mismo día que las muestras correspondientes. En el caso de muestras a concentraciones superiores al ULOQ, éstas fueron diluidas convenientemente y nuevamente analizadas.

Junto con las muestras de meconio también han sido remitidas al Servicio de Toxicología del IUML de Santiago, muestras consecutivas de la orina (14, 34, 60, 80 y 103 horas) del recién nacido. Estas muestras han sido analizadas siguiendo procedimientos ya estandarizados en nuestro laboratorio<sup>3</sup>. Se realizó un cribado previo mediante el enzimoimmunoensayo COBAS y solamente en los casos en los que el cribado fue positivo a BE y/o MOR se realizó la confirmación y cuantificación mediante GC-MS.

## **9.2.2 RESULTADOS**

### **9.2.2.1 CONDICIONES DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS**

La selección de iones para cada uno de los compuestos estudiados así como sus tiempos de retención y sus ventanas de detección se recogen en la siguiente tabla.

**Tabla 9.6.** Selección de iones monitorizados para cada uno de los compuestos con sus ventanas de detección y sus respectivos tiempos de retención.

Compuesto	Ventana de detección (min)	m/z seleccionadas*	tr (min)
COC	13,1-14,2	182, 198, <b>303</b>	13,8
COC-d <sub>3</sub>		185, 201, <b>306</b>	
BE-TMS	14,2-16,6	<b>240</b> , 361	14,9
BE-TMS-d <sub>3</sub>		<b>243</b> , 364	
COD-TMS	16,6-18,8	<b>178</b> , 234, 371	17,9
COD-TMS-d <sub>3</sub>		<b>181</b> , 237, 374	
MOR-2TMS	18,8-19,8	236, <b>414</b> , 429	18,9
MOR-2TMS-d <sub>3</sub>		239, <b>417</b> , 432	
6-MAM-TMS	19,8-22,7	287, <b>340</b> , 399	20,5
6-MAM-TMS-d <sub>3</sub>		290, <b>343</b> , 402	

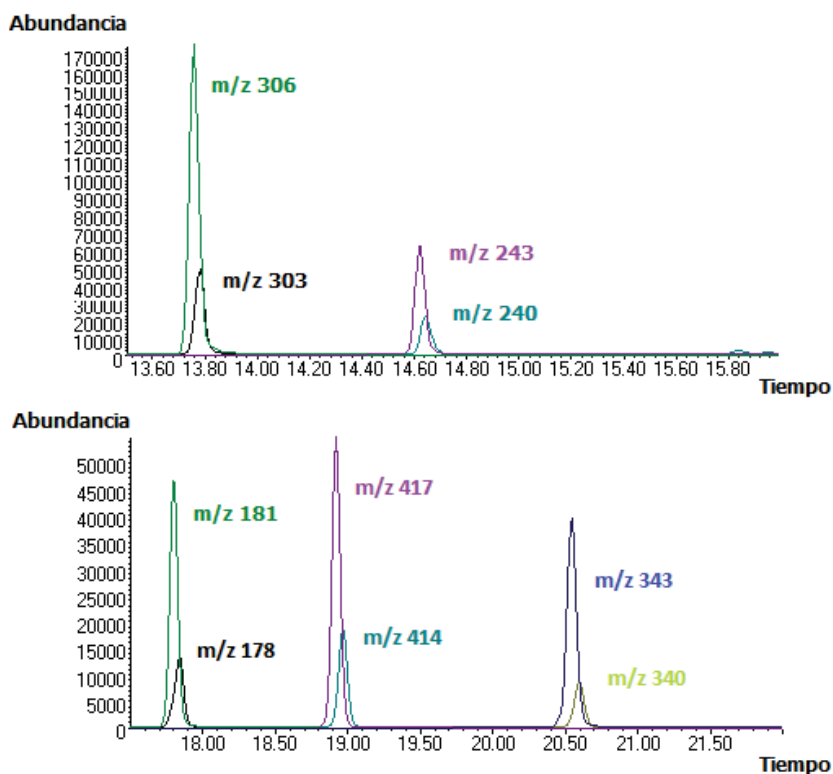
\*El ión de cuantificación figura en negrita.

Tal como se observa en la tabla, los iones seleccionados han sido los mismos que en el método anteriormente descrito (véase Tabla 9.2). Existen pequeñas variaciones en las ventanas de detección que se deben sobre todo a las tareas de mantenimiento del cromatógrafo: limpieza, cambios en la columna (desgaste, ligeras variaciones en su longitud...).

### 9.2.2.2 SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

La separación cromatográfica fue realizada en las condiciones descritas en el apartado correspondiente de Material y Métodos. A través del programa cromatográfico empleado la separación de los compuestos se logró en menos de 21 minutos.

En la Figura 9.4 se muestra el cromatograma en modo SIM del ión de cuantificación de cada uno de los compuestos analizados y sus respectivos derivados deuterados en una muestra blanco de meconio preparada a 1000 ng/g. Como se puede observar, ninguno de los compuestos estudiados se solapa en el tiempo, por lo tanto la separación es completa (Resolución > 1).

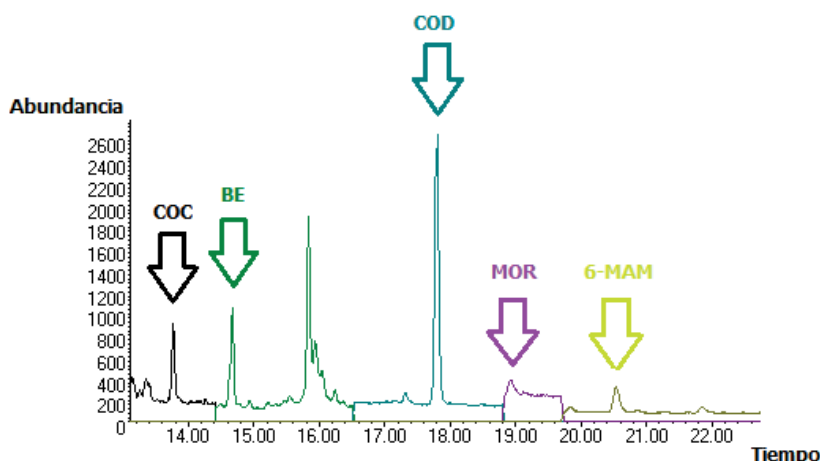


**Figura 9.4.** Cromatograma en modo SIM del ión de cuantificación de cada uno de los compuestos analizados y sus respectivos derivados deuterados en una muestra de meconio preparada a 1000 ng/g.

### 9.2.2.3 RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN

#### 9.2.2.3.1 SELECTIVIDAD

En las ocho muestras blanco de meconio analizadas se comprobó que no existían interferencias con los analitos de interés, tanto para el ión de cuantificación como para el ión/iones de confirmación. La Figura 9.3 muestra el cromatograma en modo SIM de los iones de cuantificación de los compuestos analizados en una de las muestras blanco de meconio.



**Figura 9.5.** Cromatograma en modo SIM de los iones de cuantificación de los compuestos analizados en una muestra blanco de meconio.

#### 9.2.2.3.2 LINEALIDAD, LÍMITES, PRECISIÓN, EXACTITUD Y RENDIMIENTO

La linealidad de la relación de áreas compuesto/PI frente a la concentración teórica, fue verificada en el método propuesto usando el modelo de mínimos cuadrados. Los coeficientes de regresión ( $r^2$ ) fueron superiores a 0,99 en todos los casos.

El LOD observado para la COC y la COD fue de 5 ng/g, mientras que para la BE, MOR y 6-MAM fue de 10 ng/g. El LLOQ y el ULOQ, que se corresponden respectivamente con el valor inferior y superior de la recta de calibrado, fueron 20 y 1000 ng/g para todos los compuestos.

La precisión (intradía e interdía) expresada como CV y la exactitud (intradía e interdía) expresada como MRE, estudiadas ambas para el LLOQ (20 ng/g), el ULOQ (1000 ng/g) y para un punto intermedio de la recta de calibrado (500 ng/g), fueron menores del 15%, o del 20% en el caso del LLOQ, para todos los compuestos estudiados.

El rendimiento del proceso de extracción calculado a dos valores de concentración intermedios (200 y 500 ng/g), fue en todos los casos superior al 40%, variando éste entre el 40,14 y 72,84%.



Los parámetros de validación obtenidos para cada uno de los compuestos han sido recogidos en la siguiente tabla.

**Tabla 9.7.** Principales parámetros de validación del método.

	Conc ng/g	LOD ng/g	LOQ ng/g		Precisión y exactitud intradía (%)		Precisión y exactitud interdía (%)		R (%)
			LLOQ	ULOQ	CV	MRE	CV	MRE	
COC	20	5	20	1000	18,15	19,54	20,84	12,17	40,65
	200								
	500				2,989	6,486	5,372	6,157	
	1000				5,422	9,263	1,129	1,380	
Curva de calibración (n=6): A=0,007±0,003, B=1,523±0,081, r²=0,996±0,002									
BE	20	10	20	1000	14,77	14,08	11,40	10,12	40,14
	200								
	500				2,981	7,167	2,931	7,500	
	1000				5,667	7,357	0,598	1,564	
Curva de calibración (n=6): A=0,018±0,011, B=1,970±0,039, r²=0,996±0,002									
COD	20	5	20	1000	16,09	20,13	6,279	4,810	57,80
	200								
	500				3,765	2,268	6,277	2,482	
	1000				5,729	9,358	1,582	0,465	
Curva de calibración (n=6): A=0,083±0,008, B=1,274±0,050, r²=0,997±0,002									
MOR	20	10	20	1000	8,155	17,52	15,05	23,74	60,67
	200								
	500				3,554	4,567	7,290	5,527	
	1000				6,084	11,25	1,468	1,380	
Curva de calibración (n=6): A=0,014±0,008, B=1,932±0,080, r²=0,996±0,003									
6-MAM	20	10	20	1000	17,33	16,70	20,36	4,357	40,30
	200								
	500				3,224	4,141	5,454	4,031	
	1000				6,046	10,52	1,347	0,922	
Curva de calibración (n=6): A=0,010±0,006, B=1,155±0,058, r²=0,997±0,002									

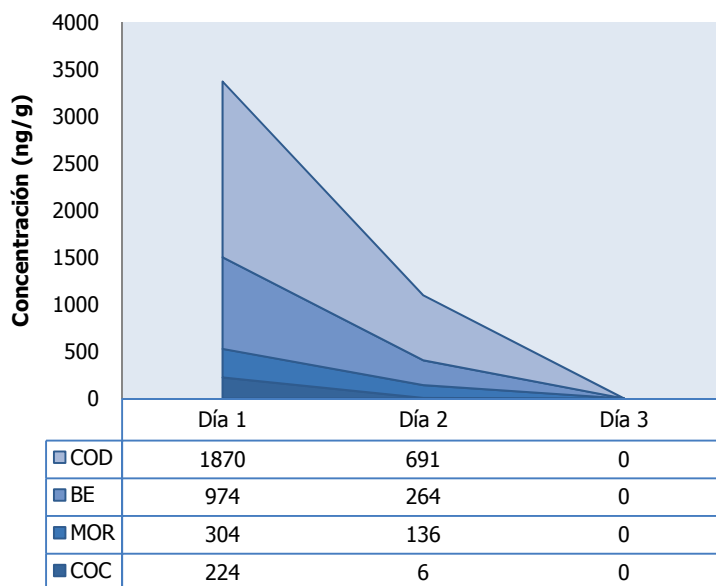
#### 9.2.2.4 APLICACIÓN A CASOS REALES

En la Tabla 9.8 se muestran los resultados de *screening* de las muestras consecutivas de orina del recién nacido analizadas mediante COBAS. La cuantificación de las dos orinas con *screening* positivo indicó la presencia de COC, BE, COD y MOR en ambas muestras, siendo la concentración de BE mayor que la concentración de COC, y la concentración de COD mayor que la concentración de MOR.

**Tabla 9.8.** Resultados del *screening* mediante COBAS de las muestras de orina del recién nacido.

Hora	BE	MOR
<b>14</b>	+	+
<b>34</b>	+	+
<b>60</b>	-	-
<b>80</b>	-	-
<b>103</b>	-	-

Los resultados de GC-MS obtenidos para las 3 muestras de meconio analizadas han sido representados en un gráfico (Figura 9.6). En éste se puede observar la evolución de la distribución de las sustancias estudiadas en las muestras de meconio los días consecutivos al nacimiento. Los resultados demuestran la existencia de COC, BE, COD y MOR en los meconios del primer y segundo día, siendo, en ambos casos, la BE y la COD los compuestos mayoritarios. En el meconio del tercer día, las concentraciones de los compuestos estudiados fueron nulas.



**Figura 9.6.** Resultados GC-MS de las muestras de meconio consecutivas.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. López P, Bermejo AM, Tabernero MJ, Fernández P, Alvarez I,. Determination of cocaine and heroin with their respective metabolites in meconium by gas chromatography-mass spectrometry. *J Appl Toxicol* 27(5) (2007) 464-471.
2. López P, Bermejo AM, Tabernero MJ, Cabarcos P, Alvarez I, Fernandez P. Cocaine and opiates use in pregnancy: detection of drugs in neonatal meconium and urine. *J Anal Toxicol* 33(7) (2009) 351-355.
3. Álvarez I, Palos F, Bermejo AM, Fernández P, Tabernero MJ. Simultaneous determination of methadone, heroin, cocaine and their metabolites in urine using GC-MS. *Anal Lett* 39(7) (2006) 1393-1399.

# Anexos



## Determination of cocaine and heroin with their respective metabolites in meconium by gas chromatography-mass spectrometry

P. López, A. M. Bermejo,\* M. J. Tabernero, P. Fernández and I. Álvarez

Institute of Legal Medicine, Forensic Toxicology Service, Faculty of Medicine, San Francisco, s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain

Received 25 October 2006; Revised 21 December 2006; Accepted 21 December 2006

**ABSTRACT:** The analysis of meconium specimens is a relatively accurate method for the detection of fetal exposure to drugs. The purpose of this study was to develop and validate a method for meconium sample preparation for a gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) confirmation of meconium extracts for cocaine, benzoylecgonine, codeine, morphine and 6-monoacetylmorphine. The analytes were initially extracted from the matrix by methanol. Subsequently a solid-phase extraction with Waters Oasis® HLB cartridges was applied. Analytes were determined in GC-MS single monitoring mode. The method was validated in the range 40–2000 ng g<sup>-1</sup> using 0.5 g of meconium per assay. The detector response was linear over the studied range, and limits of quantitation and detection were found to be acceptable. Intra- and inter-batch coefficients of variation oscillated between 2.54% and 20.5%, and mean relative errors were in the range 0.79%–19.9%. The recoveries were higher than 42.1% in all cases. Finally the method was applied to analysis of meconium in newborns to assess fetal exposure to cocaine and opiates. Copyright © 2007 John Wiley & Sons, Ltd.

**KEY WORDS:** cocaine; opiates; meconium; SPE; GC-MS

### Introduction

Newborns that have been exposed to drugs of abuse *in utero* may have characteristic physical and mental development problems throughout their lives (Kwong and Ryan, 1997). It is therefore desirable to diagnose and begin treatment of these individuals as early as possible.

Testing a newborn's urine helps to identify some drug-exposed neonates, but not all. Urine taken from the baby shortly after birth only identifies drugs that the mother took within the two weeks prior to birth. Most drugs of abuse are capable of crossing the placenta at rates controlled by their molecular size, ionization state, lipophilicity and degree of plasma protein or placental tissue binding (Chan *et al.*, 2004). Placental transfer of most drugs of abuse takes place primarily by passive diffusion due their small molecular size and high lipophilicity; because of this, placental blood flow may be the most critical limiting factor regarding drug transport to the fetus (Szeto, 1993). Ultimately, fetal exposure

is a product of maternal consumption, metabolism and elimination, placental transfer and metabolism, and fetal metabolism (Chan *et al.*, 2004). These factors make meconium an optimal matrix for identifying *in utero* exposure as it is considered to be static once deposited in the fetal intestine (Abusada *et al.*, 1993), a preserved record of the ultimate exposure by the fetus.

Solid-phase extraction has several advantages over liquid–liquid extraction: decreased solvent volumes, resulting in decreased solvent disposal costs; reduced operator time; high recovery of analytes; and low limits of detection and quantitation for the analytes. Most importantly, solid-phase extraction yields clean extracts and minimizes the appearance of endogenous peaks, thereby increasing analyte sensitivity and specificity (Lillsunde and Korte, 1991).

The metabolic profile of cocaine in meconium was first reported as far back as 1992 (Clark *et al.*, 1992). Further, it has been widely reported that failure to identify *m*-hydroxybenzoylecgonine in meconium will cause a misdiagnosis of screen positive neonates (Steele *et al.*, 1993). Other publications include this metabolite (Oyler *et al.*, 1996; Pichini *et al.*, 2005) and in 2000, Xia *et al.* published the determination of cocaine and 15 of its metabolites in meconium. A review of the literature shows several reports dealing with the analysis of meconium

\* Correspondence to: A. M. Bermejo, Institute of Legal Medicine, Forensic Toxicology Service, Faculty of Medicine, San Francisco, s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain.  
E-mail: apimlana@usc.es

specimens for cocaine and/or opiates using different immunoassays such as radioimmunoassay (RIA) (Ostrea Jr *et al.*, 1989; 1994), Fluorescence polarization immunoassay (TDx) (Howe *et al.*, 1994; Franssen *et al.*, 1994) and Enzyme Multiplied Immunoassay (EMIT) (Moriya *et al.*, 1994; ElSohly *et al.*, 2001). Confirmation for the presence of these analytes was carried out by techniques such as thin-layer chromatography (TLC) (Moriya *et al.*, 1994), high-performance liquid chromatography (HPLC) (Franssen *et al.*, 1994), or gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) (ElSohly *et al.*, 2001; Salem *et al.*, 2001).

The aim of this work was to develop a procedure that allows the determination of cocaine and heroine metabolites in meconium samples using solid phase extraction and GC-MS analysis to confirm RIA results.

## Experimental

### Chemical Reagents and Standards

Methanol and acetonitrile from Merck® (Darmstadt, Germany) were gradient grade solvents. Cocaine, benzoyl-ecgonine (BE), codeine, morphine and 6-acetylmorphine (6AM) were purchased from Lipomed® (Mundolsheim Cédex, France), and their respective deuterated-labeled analogues, CO-d<sub>3</sub>, BE-d<sub>3</sub>, CD-d<sub>3</sub>, M-d<sub>3</sub>, 6AM-d<sub>3</sub> solutions were purchased from Cerilliant® (Round Rock, TX). HCl, NaOH, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, KCl, CH<sub>3</sub>COOH, trimethylchlorosilane (TMCS) and N,O-bis-trimethylsilyl-trifluoroacetamide (BSTFA) were obtained from Merck®.

### Preparation of Solutions

The borax buffer, pH 9, was prepared by mixing 6.2 g of H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> and 7.5 g of KCl with 420 ml of 0.1 M NaOH and making up to 1 l with distilled water.

Stock standard solutions at a concentration of 1 mg ml<sup>-1</sup> were prepared in acetonitrile for cocaine and in methanol for the rest in volumetric glassware. Working solutions were prepared by dilution of the stock standards with acetonitrile or methanol and stored at -20 °C until analysis. The internal standard (I.S.) working solution was used at a concentration of 10 µg ml<sup>-1</sup>.

### Meconium Samples

Meconium samples came from the Hospital Clínico Universitario in Santiago de Compostela, Spain. The meconium was collected from 30 babies. The stools were frozen and stored at -20 °C prior to analysis. Blank meconium was tested prior to use.

## Meconium Processing

### Preparation of the Sample

A 0.5 g of meconium with 50 µl of I.S. working solution was transferred into 25 ml screw-capped glass tubes and 3 ml of methanol was added. The tubes were placed in a horizontal shaker for 20 min. After centrifugation at 2000 rpm for 10 min the organic layer was dried under nitrogen. The dried extracts were then dissolved in 1 ml borax buffer, pH 9.2 and applied on a Waters Oasis® HLB solid-phase extraction (SPE) column, which had been preconditioned with 2 ml methanol followed by 2 ml distilled water. The cartridge was then washed with 2 ml 5% methanol/distilled water, followed by 2 ml 20% NH<sub>4</sub>OH/80% (2% MeOH/distilled water) and allowed to dry for 20 min under vacuum. The analytes were eluted with 2 ml 2% CH<sub>3</sub>COOH/MeOH, and the eluent was evaporated to dryness under a gentle nitrogen stream.

### Derivatization

A 40 µl volume of BSTFA-TMCS (99:1) was added to the dried extracts. The tubes were tightly closed, vortex mixed (10 s) and heated at 100 °C for 20 min. After cooling at room temperature, 1 µl was injected into the gas chromatograph.

### GC/MS Analysis

The analyses were carried out on a gas chromatograph Hewlett-Packard® 6890 Series equipped with a mass selective detector Hewlett-Packard® 5973 Inert. The chromatographic separation was achieved using an HP-5 column (30 m × 250 µm i.d.) with film thickness of 0.25 µm purchased from Agilent Technologies (Milan, Italy). Helium was used as a carrier gas at a flow rate of 1 ml min<sup>-1</sup>. The injector was maintained at 240 °C and operated for 2 min in splitless mode. The column temperature was initially programmed at 90 °C (1 min), followed by a 30 °C/min ramp to 190 °C (1 min), then a second 8 °C/min ramp to 260 °C (4 min) and finally the temperature was kept at 290 °C (10 min). The mass selective detector was kept at 300 °C, the ion source at 250 °C and the quadrupole at 100 °C. The mass analyser operated by electron impact (70 eV) in selected ion monitoring (SIM) acquisition mode. Table 1 shows retention times and selected ions for the analytes of interest and their corresponding internal standards.

### Method Validation

Prior to application to real samples, the method was tested using the following criteria: selectivity, linearity and limits of detection and quantitation, intra- and inter-batch precision and accuracy and recovery.



**Table 1.** Retention times and selected ions of the analytes and the corresponding internal standards

Analyte	Retention time (min)	Selected <i>m/z</i> ratios <sup>a</sup>
Cocaine	12.6	182, 198, <b>303</b>
Cocaine-d <sub>3</sub>	12.6	185, 201, <b>306</b>
BE	13.2	<b>240</b> , 361
BE-d <sub>3</sub>	13.2	<b>243</b> , 364
Codeine	15.2	<b>178</b> , 234, 371
Codeine-d <sub>3</sub>	15.2	<b>181</b> , 237, 374
Morphine	15.7	236, <b>414</b> , 429
Morphine-d <sub>3</sub>	15.7	239, <b>417</b> , 432
6AM	16.6	287, <b>340</b> , 399
6AM-d <sub>3</sub>	16.6	290, <b>343</b> , 402

<sup>a</sup> Quantifying ions are in bold characters.

### Selectivity

A total of eight meconium samples from newborns of mothers who maintained that they had never consumed cocaine and opiates, were extracted and analysed for assessment of potential interferences from endogenous substances. The apparent response at the retention times of the analytes under investigation was compared with the response of analytes at the limit of quantitation.

### Calibration and Sample Quantification

Calibration, using internal standardization, was done by linear regression analysis over a maximum concentration range from 40 to 2000 ng g<sup>-1</sup>, which is clinically relevant to monitor drug use by meconium analysis. For each standard curve, six different concentrations were used, not including the blank matrix. The regression line was calculated by the method of least squares and linearity was expressed by the correlation coefficient (*r*<sup>2</sup>).

The sensitivity of the method was evaluated by determining the limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ). The LOD was defined as the concentration with a signal-to-noise (S/N) ratio of at least 3, while the LOQ was the lowest standard with an S/N ratio of at least 10 and acceptable precision and accuracy. Both parameters were determined empirically by analysis of a series of decreasing concentrations of the drug-fortified plasma in five replicates.

### Precision and Accuracy

Precision and accuracy were evaluated over the linear dynamic range (40–2000 ng g<sup>-1</sup>). Intra-batch precision and accuracy was assessed with five determinations per concentration in one day, while inter-batch precision and accuracy was evaluated by six determinations per concentration in different days. Precision (coefficient of variation) was calculated as: (standard deviation/mean) × 100, while accuracy was calculated as: (mean concen-

tration quality control – nominal concentration)/nominal concentration) × 100.

### Recovery

Recovery or extraction efficiency (%) for each analyte was determined at low and high concentration levels, and calculated by comparing the areas of peaks after extraction of samples with the internal standard and the drugs, with those peaks obtained after extraction of samples only with the internal standard and subsequently spiked with the drugs at the same concentrations.

## Results and Discussion

Certain extraction procedures may exclude specific metabolites due to differences in pH that subsequently affect ionization state (Murphey *et al.*, 1993). Acid extraction procedures were originally used for immunoassay (Ostrea Jr *et al.*, 1989; Ostrea Jr *et al.*, 1988), but extraction with methanol was later found to result in much higher sensitivity and a lower limit of detection (ElSohly *et al.*, 2001; Salem *et al.*, 2001; Murphey *et al.*, 1993; Ryan *et al.*, 1994).

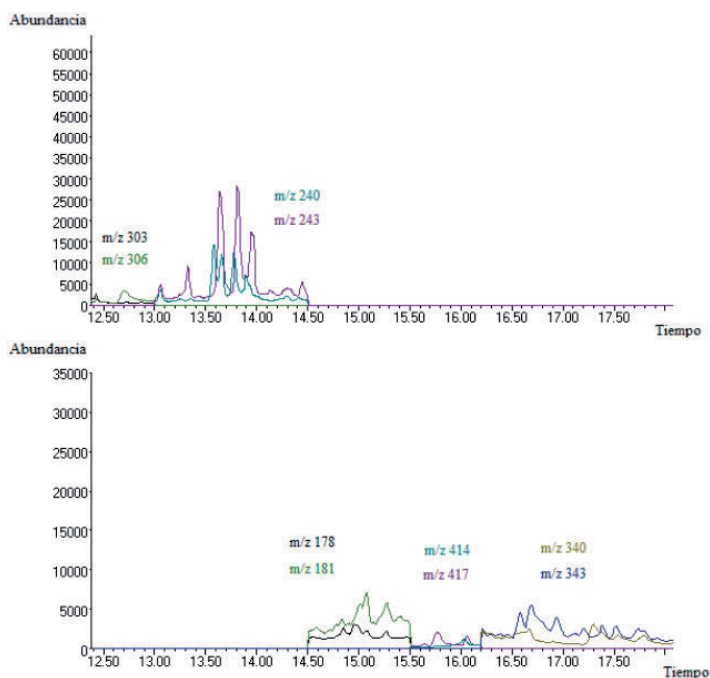
The study was performed using Waters Oasis® HLB cartridges. The material used in this kind of column is a copolymer designed to have a hydrophilic-lipophilic balance (HLB) that gives high and reproducible recoveries for acidic, basic and neutral compounds, even if the cartridge runs dry. For this reason, the pH of the eluted samples through the cartridges is of the utmost importance, and the recovery depends on the ionized or non-ionized form of the analytes (Franke and de Zeeuw, 1998). Borax buffer at pH 9.2 was found to be an optimal medium because it was effective for extracting the compounds of interest without degradation.

### Selection of Ions

Selected ions for this study were the same as those used by López *et al.* (2006) to analyse these metabolites in human hair. However, quantitation ions selected for this study were not the same as in the case of human hair. This selection was based on the following: the corresponding ion from the analyte and its deuterated analogue must not occur in the meconium blank as an endogenous interference. These monitored ions were checked in standards and in samples to make sure that they were the same.

### Selectivity

A chromatographic run was completed in 18 min. No additional peak due to endogenous substances that could



**Figure 1.** SIM chromatogram of an extract of 0.5 g drug-free meconium sample. This figure is available in colour online at [www.interscience.wiley.com/journal/jat](http://www.interscience.wiley.com/journal/jat)

have interfered with the detection of compounds of interest was observed (Fig. 1).

#### Linearity and Limits of Detection and Quantification

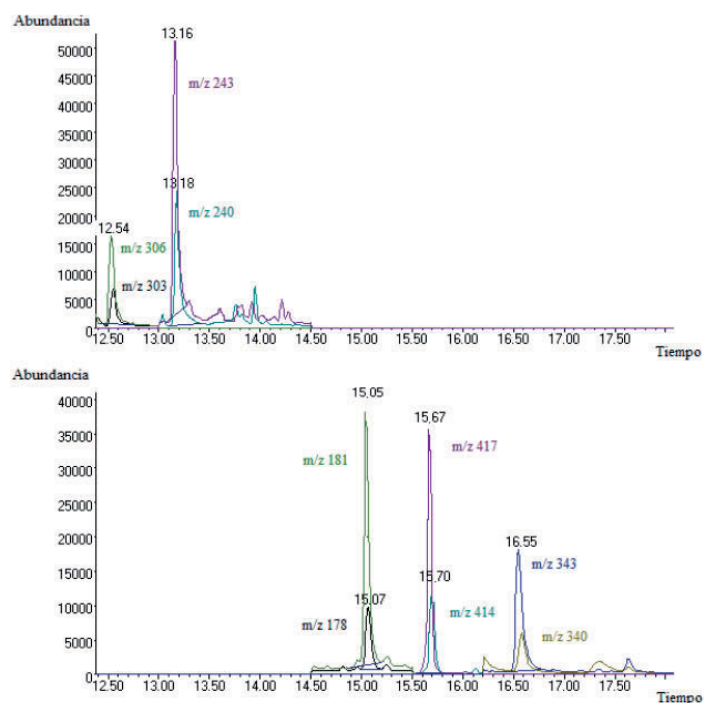
Linear calibration curves were obtained with an average correlation coefficient higher than 0.99 for the compounds of interest. A representative chromatogram obtained following the extraction of 200 ng cocaine, BE, codeine, morphine, 6AM and their respective deuterated analogues, spiked in 0.5 g of drug-free meconium is shown in Fig. 2. Limits of detection and quantification were considered adequate for the purpose of the study (Table 2). The results of linearity are similar to those obtained by Pichini *et al.* (2003) using both Bond Elut Certify cartridges. Concerning the limits of quantification for reported metabolites, they were lower than those used in previous studies (Pichini *et al.*, 2003; ElSohly *et al.*, 1999).

#### Precision and Accuracy

Table 3 provides the results obtained for intra-assay and inter-assay precision and accuracy calculations for all analytes. The intra- and inter-precision were in the range 1.25–20.5% and 4.07–17.9%, respectively, while the intra- and inter-accuracy were 1.75–18.6% and 0.79–19.9%, respectively. Precision and accuracy of analytes under investigation at reported concentrations satisfactorily met the international established acceptance criteria (<http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf>).

#### Recovery

The recoveries obtained are presented in Table 4. These results suggested that at a low analyte concentration, the mean recoveries were lower than at a high analyte concentration.



**Figure 2.** SIM chromatogram of an extract of 0.5 g drug-free meconium sample spiked with 200 ng cocaine, BE, codeine, morphine, 6AM and their respective deuterated analogues. This figure is available in colour online at [www.interscience.wiley.com/journal/jat](http://www.interscience.wiley.com/journal/jat)

**Table 2.** Method calibration

Analyte	Calibration line	Correlation coefficient ( $r^2$ )	LOD ( $\text{ng g}^{-1}$ )	LOQ ( $\text{ng g}^{-1}$ )
Cocaine	$y = 0.0010x$	0.996	30	40
BE	$y = 0.0012x$	0.997	30	40
Codeine	$y = 0.0005x$	0.995	30	40
Morphine	$y = 0.0016x$	0.997	20	40
6AM	$y = 0.0008x$	0.999	20	40

### Application to Meconium Sample Analysis

The developed method was applied to meconium samples collected at the Hospital Clínico Universitario in Santiago de Compostela. Thirty samples were analysed and only 10 provided positive results for cocaine and/or opiates (Fig. 3). These preliminary findings seem to disclose a prevalence of cocaine and opiates consumption

during pregnancy, but this has to be confirmed in a larger number of samples. Cocaine was detected at concentrations between 45.38 and 1864  $\text{ng g}^{-1}$ , BE at concentrations between 50.12 and 1594  $\text{ng g}^{-1}$ , codeine at concentrations between 60.95 and 600.4  $\text{ng g}^{-1}$ , morphine at concentrations between 124.9 and 825.3  $\text{ng g}^{-1}$ , and 6AM at concentrations between 100.9 and 1350  $\text{ng g}^{-1}$ . In the majority of cases, the presence of opiates was negative.

**Table 3.** Precision and accuracy obtained for analytes under investigation

Concentration added (ng g <sup>-1</sup> )		Intra-batch study (n = 5)		Inter-batch study (n = 6)	
		C.V. (%)	Relative mean error (%)	C.V. (%)	Relative mean error (%)
Cocaine	40	12.8	9.50	15.7	9.31
	200	—	—	12.1	7.95
	400	—	—	12.1	13.1
	1000	7.56	3.64	10.3	9.11
	1500	—	—	4.07	0.80
BE	2000	2.54	2.66	4.19	1.75
	40	8.16	14.8	12.6	19.9
	200	—	—	10.6	4.65
	400	—	—	9.97	1.55
	1000	4.78	11.1	5.90	13.8
Codeine	1500	—	—	4.86	4.93
	2000	11.1	1.75	4.48	1.45
	40	20.5	7.50	9.90	16.8
	200	—	—	9.22	14.9
	400	—	—	10.7	1.02
Morphine	1000	7.71	2.80	10.7	0.79
	1500	—	—	11.0	3.52
	2000	7.63	4.90	5.80	5.84
	40	3.33	18.9	6.69	13.1
	200	—	—	8.89	13.6
6AM	400	—	—	9.45	6.87
	1000	5.17	2.51	6.62	4.24
	1500	—	—	9.55	4.13
	2000	3.08	3.30	5.54	2.45
	40	7.02	18.6	11.8	19.1
	200	—	—	6.78	13.8
	400	—	—	10.3	5.65
	1000	9.01	2.59	11.7	1.90
	1500	—	—	5.90	1.40
	2000	1.25	3.50	4.62	2.00

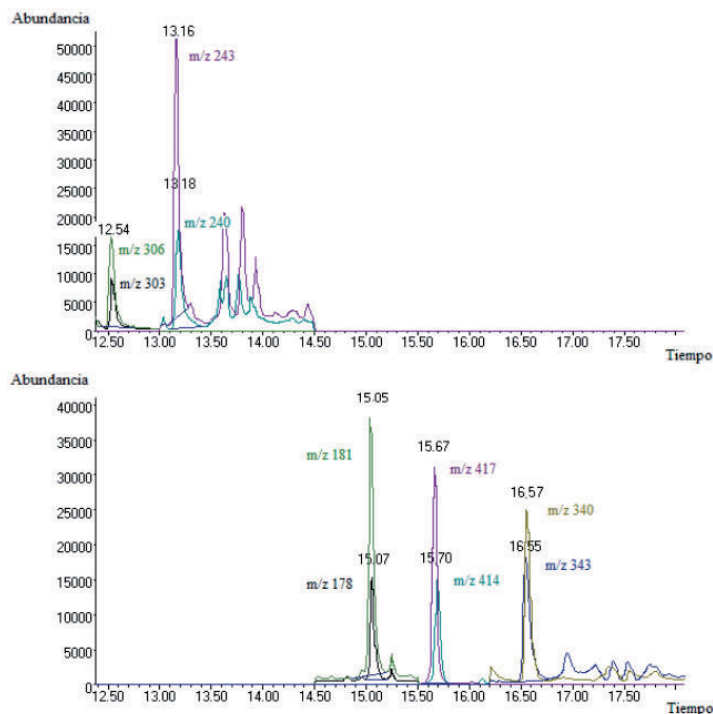
**Table 4.** Recovery of analytes under investigation

Analyte	n	Concentration (ng g <sup>-1</sup> )	Mean recovery (%)	CV (%)
Cocaine	4	400	52.8	9.43
		1000	68.3	7.45
BE	4	400	42.1	15.0
		1000	60.9	4.78
Codeine	4	400	64.6	2.25
		1000	82.4	12.4
Morphine	4	400	53.8	4.24
		1000	54.0	5.15
6AM	4	400	61.1	11.0
		1000	87.4	14.2

These findings are in accordance with those reported by some authors, which found cocaine and 6AM as the most relevant analytes to indicate exposure to these illicit drugs (Pichini *et al.*, 2005). Concerning opiates, the high concentration of 6AM in meconium samples confirmed heroin consumption and excluded, in the majority of cases, the use of over the counter anti-tussive, analgesic or anti-diarrhoeal preparations containing opiate-derivates.

## Conclusions

The GC-MS method to analyse cocaine and opiates in meconium reported in this paper was validated in the range 40–2000 ng g<sup>-1</sup>, according to internationally acceptance criteria (Pichini *et al.*, 2003). The method consists of sample preparation by liquid and solid-phase extraction, followed by chromatographic separation and detection in SIM mode, and it proved to be sensitive



**Figure 3.** SIM chromatogram of an extract of sample 4 containing 525.3 ng g<sup>-1</sup> cocaine, 321.4 ng g<sup>-1</sup> BE, 600.4 ng g<sup>-1</sup> codeine, 825.3 ng g<sup>-1</sup> morphine and 1350 ng g<sup>-1</sup> 6AM. This figure is available in colour online at [www.interscience.wiley.com/journal/jat](http://www.interscience.wiley.com/journal/jat)

enough for determination of all compounds of interest using 0.5 g of meconium. It is concluded that meconium analysis by GC-MS can provide a wide window for the detection of fetal exposure to cocaine and opiates.

## References

- Abusada GM, Abukhalaf IK, Alford DD, Vinzon-Bautista I, Pramanik AK, Ansari NA, Manno JE, Manno BR. 1993. Solid-phase extraction and GC/MS quantitation of cocaine, ecgonine methyl ester, benzoylecgonine, and cocaethylene from meconium, whole blood, and plasma. *J. Anal. Toxicol.* **17**: 353–358.
- Chan D, Klein J, Koren G. 2003. New methods for neonatal drug screening. *NeoReviews* **4**: 236–244.
- Clark GD, Rosenzweig IB, Raisys V, Callahan CM, Grant TM, Streissguth AP. 1992. The analysis of cocaine and benzoylecgonine in meconium. *J. Anal. Toxicol.* **16**: 261–263.
- ElSohly MA, Feng S, Murphy TP. 2001. Analysis of methadone and its metabolites in meconium by enzyme immunoassay (EMIT®) and GC-MS. *J. Anal. Toxicol.* **25**: 40–44.
- ElSohly MA, Kopycki W, Feng S, Murphy T. 1999. Identification and analysis of the major metabolites of cocaine in meconium. *J. Anal. Toxicol.* **23**: 446–451.
- Food and Drug Administration: U.S. Department of Health and Human Services, Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. FDA [document on line] [cited 21 January 2003]. Available from URL: <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf>.
- Franke JP, de Zeeuw RA. 1998. Solid-phase extraction procedures in systematic toxicological analysis. *J. Chromatogr. B* **713**: 51–59.
- Franssen RME, Stolk LML, van der Brand W, Smith BJ. 1994. Analysis of morphine and amphetamine in meconium with immunoassay and HPLC-diode array detection. *J. Anal. Toxicol.* **18**: 294–295.
- Howe T, Tsushima JH, Batra KK. 1994. Neonatal screening of meconium for drugs of abuse by abbot TDx with GC and GC/MS confirmation: comparison with urine EMIT results. *Abstract Clin. Chem.* **38**: 1005.
- Kwong TC, Ryan RM. 1997. Detection of intrauterine illicit drug exposure by newborn drug testing. *Clin. Chem.* **43**: 235–242.
- Lilliusunde P, Korte T. 1991. Comprehensive drug screening in urine using solid phase extraction and combined TLC and GC/MS identification. *J. Anal. Toxicol.* **15**: 71–78.
- López P, Bermejo AM, Tabernero MJ, Fernández P, Álvarez I. 2006. Determination of cocaine and heroin with their respective metabolites in human hair using gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Lett.* **39**: 2307–2316.

- Moriya F, Chan KM, Noguchi TT, Wu PYK. 1994. Testing for drugs of abuse in meconium of newborn infants. *J. Anal. Toxicol.* **18**: 41–45.
- Murphey LJ, Olsen GD, Konkol RJ. 1993. Quantitation of benzoylecgonine and other cocaine metabolites in meconium by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **613**: 330–335.
- Ostrea EM Jr, Brady MJ, Parks PM, Asensio DC, Naluz A. 1989. Drug screening in infants of drug dependent mothers: an alternative to urine testing. *J. Pediatr.* **115**: 474–477.
- Ostrea EM Jr, Parks PM, Brady MJ. 1988. Rapid isolation and detection of drugs in meconium of infants of drug-dependent mothers. *Clin. Chem.* **34**: 2372–2373.
- Ostrea EM Jr, Romero A, Knapp DK, Ostrea AR, Lucena JE, Utarnachit RB. 1994. Postmortem drug analysis of meconium in early-gestation human fetuses exposed to cocaine: Clinical implications. *J. Pediatr.* **124**: 477–479.
- Oyler J, Darwin WD, Preston KL, Suess P, Cone EJ. 1996. Cocaine disposition in meconium from newborns of cocaine-abusing mothers and urine of adult drug users. *J. Anal. Toxicol.* **20**: 453–462.
- Pichini S, Marchei E, Pacifici R, Pellegrini M, Lozano J, García-Algar O. 2005. Application of a validated high performance liquid chromatography-mass spectrometry assay to analysis of meta-hydroxybenzoylecgonine and para hydroxybenzoylecgonine in meconium. *J. Chromatogr. B* **820**: 151–156.
- Pichini S, Pacifici R, Pellegrini M, Marchei E, Pérez-Alarcon E, Puig C, Vall O, García-Algar O. 2003. Development and validation of a liquid chromatography-mass spectrometry assay for the determination of opiates and cocaine in meconium. *J. Chromatogr. B* **794**: 281–292.
- Pichini S, Puig C, Zuccaro P, Marchei E, Pellegrini M, Murillo J, Vall O, Pacifici R, García-Algar O. 2005. Assessment of exposure to opiates and cocaine during pregnancy in a Mediterranean city. Preliminary results of the 'Meconium Project'. *Forensic Sci. Int.* **153**: 59–65.
- Ryan RM, Wagner CL, Schultz JM, Varley J, DiPeta J, Sherer DM, Phelps DL, Kwong T. 1994. Meconium analysis for improved identification of infants exposed to cocaine *in utero*. *J. Pediatr.* **125**: 435–440.
- Salem MY, Ross SA, Murphy TP, ElSohly MA. 2001. GC-MS determination of heroin metabolites in meconium: evaluation of four solid-phase extraction cartridges. *J. Anal. Toxicol.* **25**: 93–98.
- Steele BW, Bandstra ES, Wu NC, Hime GW, Hearn WL. 1993. m-Hydroxybenzoylecgonine: an important contributor to the immunoreactivity in assays for benzoylecgonine in meconium. *J. Anal. Toxicol.* **17**: 348–352.
- Szeto H. 1993. Kinetics of drug transfer to the fetus. *Clin. Obstet. Gynecol.* **36**: 246–254.
- Xia Y, Wang P, Bartlett MG, Solomon HM, Busch KL. 2000. An LC/MS/MS method for the comprehensive analysis of cocaine and cocaine metabolites in meconium. *Anal. Chem.* **72**: 764–771.

## Cocaine and Opiates Use in Pregnancy

P. López\*, A.M. Bermejo, M.J. Tabernero, P. Cabarcos, I. Álvarez, and P. Fernández

*Institute of Legal Medicine, Forensic Toxicology Service, Faculty of Medicine, University of Santiago de Compostela, San Francisco, s/n, 15782, Santiago de Compostela, Spain*

### Abstract

In this study, the case of a newborn with symptoms of hyperexcitability was analyzed. After it was confirmed in the hospital that the mother had consumed drugs during pregnancy using an enzyme multiplied immunoassay technique, samples of the newborn's urine and meconium were sent to our laboratory to observe the evolution in the distribution of cocaine and opiates during the days following birth. For urine analysis, screening was done with an immunoassay technique, and the confirmation was done by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) according to a published method. A GC–MS method for simultaneous analysis of cocaine, benzoylecgonine, codeine, morphine, and 6-acetylmorphine in meconium is described. GC–MS confirmation of urine and meconium results showed consumption of cocaine and codeine during pregnancy and also showed the levels of drugs gradually declined, totally disappearing by the third day.

### Introduction

Maternal cocaine use during pregnancy is a significant public health problem. The number of pregnant women using cocaine in society is increasing. This is a result of the increase of cocaine use in the general population due to the easy availability of inexpensive cocaine, its addictive quality, and society's permissive attitude towards substance abuse in general.

Prenatal cocaine use is a serious problem in our society. Cocaine use in pregnancy is associated with obstetric complications to the mother, fetus and newborn. These effects depend on the dose, duration of drug ingestion and gestational age. Maternal complications of cocaine use in pregnancy include placental abruption (1–7), preterm labor (4,5,8), and death (2,5). Complications to the fetus include spontaneous abortion (4,5,8), congenital malformation (4,5,9), intrauterine growth restriction (IUGR) (2,4,5,10,11), abnormal CTG tracing (5), preterm delivery (4,5,11,12), and stillbirth (4,5). Effects on the newborn can include meconium stained liquor (5,10) and neonatal abstinence syndrome (NAS) (5,8), nevertheless the presence of NAS after cocaine use is less clear than after

opiate use, with neurobehavioral abnormalities appearing 2–3 days after birth (10).

Consumption of other substances of abuse such as alcohol, heroin or tobacco together with cocaine may act synergistically to worsen the adverse effects of cocaine on the newborn, fetus and mother. Various studies have documented that cocaine users during pregnancy are more likely than non-users to use other drugs, such as tobacco, alcohol and other substances of abuse (13).

It is frequently difficult to obtain trustworthy information about the consumption of toxic substances during pregnancy. For this reason, the suspicion is often clinical and must be confirmed through biological matrices analysis.

A newborn's urine analysis helps identify some drug-exposed newborns, but not all. Detection of drugs in urine is only useful if exposure occurred in the last 3–7 days prior to delivery (11). Meconium is an optimal matrix for identifying in utero exposure as it is considered to be static once deposited in the fetal intestine, thus being a preserved record of the ultimate exposure by the fetus (14). In spite of increased sample preparation time relative to blood and urine, meconium's long metabolite history, coupled with the ease and wide window of collection make meconium the ideal matrix for determining fetal drug use.

Acid and methanolic extractions developed for immunoassays can be used to extract cocaine, opiates and metabolites from meconium with varying degrees of success (15–17). However, other extraction procedures with much higher sensitivity and lower limit of detection (LOD) have been developed for gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) (18) and high-performance liquid chromatography (HPLC) (19).

Cocaine crosses the placental barrier by passive diffusion (20). Review of the literature shows several reports dealing with the analysis of meconium specimens for cocaine and/or opiates using different immunoassays (17–19,21–25). Confirmation of the presence of these analytes was carried out by techniques such as thin-layer chromatography (TLC) (26), HPLC (20,25), or GC–MS (20,23,27).

The aim of this work was to validate a method that allows the determination of cocaine, benzoylecgonine (BE), codeine, morphine and 6-acetylmorphine (6AM) in meconium samples and to apply this method to meconium samples obtained the first three days of the birth of a newborn with symptoms of

\* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: patricia.lopez@usc.es.

hyperexcitability. With the same purpose, the newborn's urine will also be analyzed with a previously published method (26) after a screening test.

## Experimental

### Reagents

Methanol, acetonitrile, hexane and dichloromethane from Merck® (Darmstadt, Germany) were gradient grade solvents. Cocaine, BE, codeine, morphine, and 6AM were purchased from Lipomed® (Mundolsheim Cédex, France), and their respective deuterated-labeled analogues, cocaine-d<sub>3</sub>, BE-d<sub>3</sub>, codeine-d<sub>3</sub>, morphine-d<sub>3</sub>, 6AM-d<sub>3</sub>, solutions were purchased from Cerilliant® (Round Rock, TX). KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na, CH<sub>3</sub>COOH, ethyl acetate, 2-propanol, NH<sub>4</sub>OH, trimethylchlorosilane (TMCS), and N,O-bis-trimethylsilyl-trifluoroacetamide (BSTFA) were obtained from Merck® (Darmstadt, Germany).

### Sample specimens

Urine (14, 34, 60, 80, and 103 h) and meconium (first, second, and third day) of a newborn with symptoms of hyperexcitability were sent to our laboratory the days following birth proceeding of the Clinical Hospital of Santiago de Compostela (Spain) to observe the evolution in the distribution of cocaine and opiate. Drug consumption in pregnancy was tested previously in the hospital in mother's urine by Enzyme Multiplied Immunoassay Technique (EMIT).

### Apparatus

Screening tests were carried out on COBAS INTEGRA 400 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) and GC-MS analysis on a Hewlett-Packard® 6890 series GC equipped with a mass selective detector Hewlett-Packard® 5973 Inert (Agilent Technologies, Spain).

Analysis of urine samples by COBAS and GC-MS

A previous screening of urine samples have done using the immunoassay COBAS. Posterior the confirmation was done to each sample applying a method previously published for our laboratory (26) consisting in a liquid-liquid extraction with Toxistubes A followed by GC-MS analysis.

Analysis of meconium samples by GC-MS

### Extraction

Meconium (0.5 g) with the I.S. (50 µL, 10 ng/µL) was transferred into 25-mL screw-capped glass tubes and 4 mL of methanol were added. The samples were shaken for 10 min. After centrifugation at 2000 rpm for 10 min the organic layer was dried under nitrogen. The dried extracts were then dissolved in 2 mL phosphate buffer pH 6 and applied on a Bond Elut solid-phase extraction (SPE) column (130 mg, 3 mL), which had been preconditioned with 3 mL of methanol followed by 3 mL of distilled water and 2 mL phosphate buffer pH 6. The cartridge was then washed with 3 mL of distilled water, 1 mL of sodic acetate buffer (pH 4), 3 mL of ethyl acetate/hexane (1:1) and finally 3 mL of methanol. The analytes

were eluted with 3 mL of dichloromethane/2-propanol (80:20) + 2% NH<sub>4</sub>OH, and the eluent was evaporated to dryness under a gentle nitrogen stream.

### Derivatization

A 40-µL volume of BSTFA/TMCS (99:1) was added to the dried extracts. The tubes were tightly closed, vortex mixed (10 s), and heated at 100°C for 20 min. And finally, after cooling at room temperature, 1 µL was injected into the GC.

### GC-MS analysis

GC conditions. A 30 m × 250 µm HP-5 column (0.25 µm film thickness) was operated with a temperature program of 90°C (1 min) to 190°C (1 min) at 30°C/min, then to 260°C (4 min) at 8°C/min and finally to 290°C (10 min). Helium was used as a carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. The injector was maintained at 240°C and operated for 2 min in splitless mode.

MS conditions. The mass selective detector was kept at 300°C, the ion source at 250°C, and the quadrupole at 100°C. The mass analyzer operated by electron impact (70eV) in selected ion monitoring (SIM) acquisition mode. Table I shows retention times and selected ions for the analytes of interest and their corresponding internal standards.

### Validation of the method

Prior to application the method to meconium samples, it has been tested using the following criteria.

**Selectivity.** A total of eight meconium samples from newborns of mothers who stated they had never consumed cocaine and/or opiates, were extracted and analysed for assessment of potential interferences from endogenous substances. The apparent response at the retention times of the analytes under investigation was compared to the response of analytes at the limit of quantitation.

**Linearity.** Solutions were prepared in the range of 20 to 1000 ng/g. For each standard curve, five different concentrations were used, not including the blank matrix. The regression line was calculated by the method of least squares, and linearity was expressed by the correlation coefficient (r<sup>2</sup>).

**Table I. Retention Times and Selected Ions of the Analytes and the Corresponding Internal Standards**

Analyte	Time (min) Retention	Selected Mass-to-Charge Ratios*
Cocaine	13.8	182, 198, <b>303</b>
Cocaine-d <sub>3</sub>		185, 201, <b>306</b>
BE	14.9	<b>240</b> , 361
BE-d <sub>3</sub>		<b>243</b> , 364
Codeine	17.9	<b>178</b> , 234, 371
Codeine-d <sub>3</sub>		<b>181</b> , 237, 374
Morphine	18.9	236, <b>414</b> , 429
Morphine-d <sub>3</sub>		239, <b>417</b> , 432
6AM	20.5	287, <b>340</b> , 399
6AM-d <sub>3</sub>		290, <b>343</b> , 402

\* Quantifying ions are in bold.



**Limit of detection (LOD) and quantification (LOQ).** LOD was defined as the concentration with a signal-to-noise (S/N) ratio of at least 3 and acceptable precision and accuracy. LOQ was the lowest standard with an S/N ratio of at least 10 and acceptable precision and accuracy. Both parameters were determined empirically by analysis of a series of decreasing concentrations of the drug-fortified meconium in five replicates. Precision and accuracy: Precision and accuracy were evaluated over the linear dynamic range for three different concentrations: low limit of quantitation (LLOQ), intermediate concentration, and upper limit of quantitation (ULOQ). Intraday precision and accuracy was assessed with five determinations per concentration in one day, while interday precision and accuracy was evaluated by six determinations per concentration in different days. Precision (coefficient of variation) was calculated as (standard deviation/mean)  $\times$  100, while accuracy was calculated as (mean concentration quality control – nominal concentration)/nominal concentration  $\times$  100. Recovery: Recovery or extraction efficiency (%) for each analyte was determined at low and high concentration levels, and calculated comparing the areas of peaks after extraction of samples with the internal standard and the drugs, with those peaks obtained after extraction of samples only with the internal standard and subsequently spiked with the drugs at the same concentrations.

## Results and Discussion

### Urine results

The analysis of mother's urine done in the Clinical Hospital of Santiago de Compostela (Spain) was positive for cocaine and opiates using EMIT, but this result was not confirmed by any other method.

Table II shows the results of newborn's urine screening with COBAS. These results have been confirmed using GC–MS. This confirmation demonstrates that the positive result for cocaine was due to the presence of benzoylecgonine and cocaine in minor measure. In the case of the opiates, urine GC–MS confirmation demonstrates that the positive result was to the presence of codeine and morphine, but 6-AM was not detected.

### Meconium results

#### Validation of the method

**Selectivity.** No additional peak due to endogenous substances that could have interfered with the detection of compounds of interest was observed in their retention times (Figure 1).

**Linearity, LODs, and LOQs.** Table III shows the results of linearity and the LODs and LOQs. Linear calibration curves were obtained with an average correlation coefficient higher than 0.99 for the compounds of interest. LODs and LOQs obtained with this method are lower than those obtained previously in a published paper for our laboratory (28); therefore, this method of extraction is more sensitive.

**Precision, accuracy, and recovery.** Table IV provides the results obtained for recovery and intra- and interday precision and accuracy. Precision and accuracy of analytes under inves-

tigation at reported concentrations satisfactorily met the international established acceptance criteria (29). Higher results of recovery using Bond Elut cartridges suggested that this cartridge is better for extracting the analytes of interest than other cartridge used in our laboratory for extract the same analytes (28). Mean recoveries were lower at a low analyte concentration than at a high analyte concentration.

#### Application of the method

A representative chromatogram of the sample of meconium obtained the first day is presented in Figure 2. Figure 3 shows the table with the results of the GC–MS analyses of the meconium samples and the graphical representation of these results. Observing the graph it is possible to see clearly that as the days passed, the quantity of drugs is declining, reaching to eliminate the third day.

On the other hand, as we have seen for the urine, GC–MS results for the meconium demonstrate the existence of benzoylecgonine, cocaine, codeine, and morphine in meconium samples, being benzoylecgonine and codeine the principal compounds. The presence of cocaine and benzoylecgonine in meconium was attributed to transfer across the placenta from the mother (30,31), and the presence of codeine in higher concentration than morphine in conjunction with the abstinence

Table II. Screening Results of Urine Samples.

Hour	Day	Cocaine	Opiates
14	1	+	+
34	2	+	+
60	3	–	–
80	4	–	–
103	5	–	–

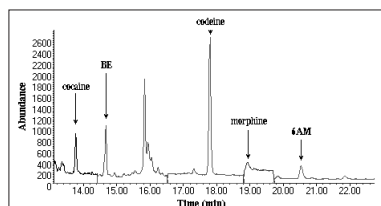


Figure 1. GC–MS chromatogram of a blank sample of meconium.

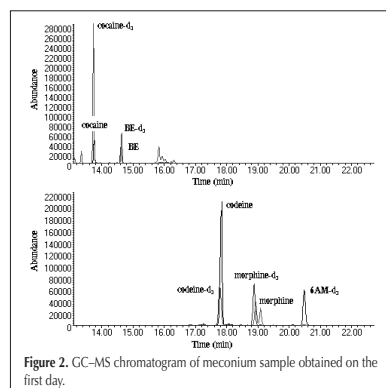
Table III. Results of the Calibration Method

Compound	Calibration Curve	Correlation Coefficient ( $r^2$ )	LOD (ng/g)	LLOQ (ng/g)
Cocaine	$y = 0.007 + 1.523x$	0.996	5	20
BE	$y = 0.018 + 1.970x$	0.996	10	20
Codeine	$y = 0.083 + 1.274x$	0.997	5	20
Morphine	$y = 0.014 + 1.932x$	0.996	10	20
6AM	$y = 0.010 + 1.155x$	0.997	10	20

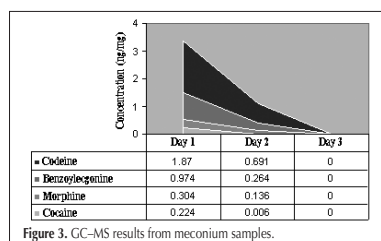
syndrome during the first hours after birth (typical of heroin consumption during gestation) led us to think that the mother's consumption was mainly codeine.

**Table IV. Precision, Accuracy, and Recovery Obtained for Analytes Investigated**

Compound	Concentration (ng/g)	Recovery (%)	Precision and Accuracy Intraday (n = 5)		Precision and Accuracy Interday (n = 5)	
			CV	MRE	CV	MRE
Cocaine	20		18.1	19.5	20.8	12.2
	100					
	200	40.6				
	500	44.9	2.99	6.49	5.37	6.16
	1000		5.47	9.26	1.13	1.38
BE	20		14.8	14.1	11.4	10.1
	100					
	200	40.1				
	500	42.3	2.98	7.21	2.93	7.50
	1000		5.67	7.36	0.60	1.56
Codeine	20		16.1	20.1	6.28	4.81
	100					
	200	57.8				
	500	72.8	3.76	2.27	6.28	2.48
	1000		5.73	9.36	1.58	0.46
Morphine	20		8.15	17.5	15.0	23.7
	100					
	200	60.7				
	500	59.4	3.55	4.57	7.29	5.53
	1000		6.08	11.2	1.47	1.38
6AM	20		17.3	16.7	20.4	4.36
	100					
	200	40.3				
	500	44.3	3.22	4.14	5.45	4.03
	1000		6.05	10.5	1.35	0.92



**Figure 2.** GC-MS chromatogram of meconium sample obtained on the first day.



**Figure 3.** GC-MS results from meconium samples.

## Conclusions

The GC-MS method to analyze cocaine and opiates in meconium reported in this paper was validated according to internationally acceptance criteria and provides a wide window for the detection of fetal exposure to cocaine and opiates.

The analysis of meconium demonstrated the exposure to cocaine and codeine during the last 20 weeks of gestation (32), whereas urine was only able to prove that these drugs had been consumed in the last hours prior to birth. Therefore, meconium can be considered an alternative for the assessment of exposure to drugs during pregnancy that cause alterations in newborns presenting symptoms of hyperexcitability, as was the case in this study.

## References

1. C. Christensen. Management of chemical dependence in pregnancy. *Obstet. Gynecol.* 51(2): 445-455 (2008).
2. Y. Oyelese and C.V. Ananth. Placental abruption. *Obstet. Gynecol.* 108(4): 1005-1016 (2006).
3. U. Von Mandach. Drug use in pregnancy. *Therapeutische Umschau* 62(1): 29-35 (2005).
4. O. Fajemirokun-Oduyeia and S.W. Lindow. Obstetric implications of cocaine use in pregnancy: a literature review. *Eur. J. Obst. Gynecol. Reprod. Biol.* 112: 2-8 (2004).
5. E. Sheiner, I. Shoham-Vardi, M. Hallak, A. Hadar, L. Gortzak-Uzan, M. Katz, and M. Mazor. Placental abruption in term pregnancies: clinical significance and obstetric risk factors. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 13(1): 45-49 (2003).
6. C.V. Ananth and A.J. Wilcox. Placental abruption and perinatal mortality in the United States. *Am. J. Epidemiol.* 153(4): 332-337 (2001).
7. B. Ritz, J.L. Atterbury and L.J. Groome. Reproductive risks of cocaine. *Hum. Reprod. Updat.* 2(1): 43-55 (1996).
8. G. Hussein Rassool, and M. Villar-Luis. Reproductive risks of alcohol and illicit drugs: an overview. *J. Addict. Nurs.* 17(4): 211-213 (2006).
9. M.A. Al-Mobagani and A.S. Mohamed. Congenital malformations in mice induced by addiction to alcohol and cocaine. *East Afr. Med. J.* 82(8): 433-438 (2005).
10. M.A. Huestis and R.E. Choo. Drug abuse's smallest victims: in utero drug exposure. *Forensic Sci. Int.* 128(1-2): 20-30 (2002).
11. N. Hendrix and V. Berghella. Non-placental causes of intrauterine growth restriction. *Semin. Perinatol.* 32(3): 161-165 (2008).
12. N.M. Vélez, I.E. García, L. García, and M. Valcárcel. The use of illicit drugs during pregnancy among mothers of premature infants. *P. R. Health Sci. J.* 27(3): 209-212 (2008).

13. C. Johanson and C.R. Schster. Cocaine. In *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*, F.E. Bloom and D.J. Kupfer, Eds. Raven Press, New York, NY, 1995.
14. J. Gareri, J. Klein, and G. Koren. Drugs of abuse testing in meconium. *Clin. Chim. Acta* 366(1-2): 101-111 (2006).
15. G.D. Clark, I.B. Rosenzweig, V.A. Raisys, C.M. Callahan, T.M. Grant, and A.P. Steissguth. The analysis of cocaine and benzoylecgonine in meconium. *J. Anal. Toxicol.* 16(4): 261-263 (1992).
16. E.M. Ostrea, Jr, M.J. Brady, P.M. Parks, D.C. Asensio, and A. Naluz. Drug screening of meconium in infants of drug-dependent mothers: an alternative to urine testing. *J. Pediatr.* 115(3): 474-477 (1989).
17. M.A. ElSohly, S. Feng, and T.P. Murphy. Analysis of methadone and its metabolites in meconium by enzyme immunoassay (EMIT®) and GC-MS. *J. Anal. Toxicol.* 25(1): 40-44 (2001).
18. Y. Xia, P. Wang, M.G. Bartlett, H.M. Solomon, and K.L. Busch. An LC-MS-MS method for the comprehensive analysis of cocaine and cocaine metabolites in meconium. *Anal. Chem.* 72: 764-771 (2000).
19. H.C. Mofenson and T.R. Caraccio. Cocaine and its metabolites are not distributed uniformly in meconium. *Pediatr. Ann.* 16(11): 864-874 (1987).
20. L.J. Murphy, G.D. Olsen, and R.J. Konkol. Quantitation of benzoylecgonine and other cocaine metabolites in meconium by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 613(2): 330-335 (1993).
21. M.A. ElSohly, D.F. Stanford, T.P. Murphy, B.M. Lester, L.L. Wright, V.L. Smeriglio, J. Verter, C.R. Baurer, S. Shankaran, H.S. Bada, and H.C. Walls. Immunoassay and GC-MS procedures for the analysis of drugs of abuse in meconium. *J. Anal. Toxicol.* 23: 436-445 (1999).
22. E.M. Ostrea Jr, A. Romero, D.K. Knapp, A.R. Ostrea, J.E. Lucena, and R.B. Utamachitt. Postmortem drug analysis of meconium in early-gestation human fetuses exposed to cocaine: clinical implications. *J. Pediatr.* 124(3): 477-479 (1994).
23. E.J.F. Franssen, L.M.L. Stolk, W. Van den Brand, and B.J. Smit. Analysis of morphine and amphetamine in meconium with immunoassay and HPLC-diode-array detection. *J. Anal. Toxicol.* 18(5): 294-295 (1994).
24. T. Howe, J.H. Tsushima, and K.K. Batra. Neonatal screening of meconium for drug abuse by Abbot TDx with GC and GC/MS confirmation: comparison with urine EMIT results. *Clin. Chem.* 38: 1005 (1994).
25. F. Moriya, K.M. Chan, T.T. Noguchi, and P.Y.K. Wu. Testing for drugs of abuse in meconium of newborn infants. *J. Anal. Toxicol.* 18(1): 41-45 (1994).
26. I. Álvarez, F. Palos, A.M. Bermejo, P. Fernández, and M.J. Tabernero. Simultaneous determination of methadone, heroin, cocaine and their metabolites in urine using GC-MS. *Anal. Lett.* 39(7): 1393-1399 (2006).
27. M.Y. Salem, S.A. Ross, T.P. Murphy, and M.A. ElSohly. GC-MS determination of heroin metabolites in meconium: evaluation of four solid-phase cartridges. *J. Anal. Toxicol.* 25(2): 93-98 (2001).
28. P. López, A.M. Bermejo, M.J. Tabernero, P. Fernández, and I. Álvarez. Determination of cocaine and heroin with their respective metabolites in meconium by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Appl. Toxicol.* 27(5): 464-471 (2007).
29. Food and Drug Administration: U.S. Department of Health and Human Services, Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. FDA [document on line] [cited 21st January 2003]. Available from URL: <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf>.
30. J. Oyler, W.D. Darwin, K.L. Preston, P. Suess, and E.J. Cone. Cocaine disposition in meconium from newborns of cocaine-abusing mothers and urine of adult drug users. *J. Anal. Toxicol.* 20(6): 453-462 (1996).
31. M.A. ElSohly, W. Kopycky, S. Feng, and T.P. Murphy. Identification and analysis of the major metabolites of cocaine in meconium. *J. Anal. Toxicol.* 23(6): 446-451 (1999).
32. C. Moore, A. Negrusz, and D. Lewis. Determination of drugs of abuse in meconium. *J. Chromatogr. B* 713: 137-146 (1998).

Manuscript received April 16, 2009;  
revision received May 29, 2009.



The background of the slide is a photograph of laboratory glassware. It features several glass bottles and beakers, some with black stoppers and others with blue caps. Some bottles have white labels with text like "(g):" and "5%". The lighting is somewhat dim, creating a professional, scientific atmosphere.

# Capítulo

# 10

## Experimental:

Aplicación a muestras de  
vello púbico materno y  
meconio del recién nacido



## Capítulo 10. Experimental: Aplicación a muestras de vello púbico materno y meconio del recién nacido

<b>10.1</b>	PACIENTES Y MÉTODOS .....	267
<b>10.1.1</b>	DESARROLLO DEL ESTUDIO.....	267
<b>10.1.2</b>	TAMAÑO MUESTRAL .....	273
<b>10.1.3</b>	POBLACIÓN ESTUDIADA .....	273
<b>10.1.4</b>	TIPO DE MUESTRAS ANALIZADAS .....	273
<b>10.1.4.1</b>	VELLO PÚBLICO MATERNO .....	273
<b>10.1.4.2</b>	MECONIO DEL RECIÉN NACIDO.....	273
<b>10.1.5</b>	DETERMINACIÓN DE COCAÍNA Y/O OPIOIDES EN MUESTRAS DE VELLO PÚBLICO MATERNO Y MECONIO.....	274
<b>10.2</b>	RESULTADOS .....	275
<b>10.3</b>	ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS .....	275
<b>10.3.1</b>	ANÁLISIS ESTADÍSTICO BÁSICO .....	275
<b>10.3.1.1</b>	MATRIZ DE DATOS .....	275
<b>10.3.1.2</b>	PRETRATAMIENTO DE LOS DATOS.....	276
<b>10.3.1.3</b>	MATRIZ DE CORRELACIÓN.....	277
<b>10.3.1.3.1</b>	CORRELACIÓN COC-BE Y COD-MOR-6-MAM.....	279
<b>10.3.1.3.2</b>	CORRELACIÓN MADRE-RECIÉN NACIDO .....	281
<b>10.3.2</b>	RELACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS POSITIVOS Y NEGATIVOS EN LA MADRE Y EL RECIÉN NACIDO.....	283
<b>10.3.3</b>	RELACIÓN ENTRE EL CONSUMO MATERNO Y LAS POSIBLES ALTERACIONES EN EL RECIÉN NACIDO .....	284
<b>10.3.4</b>	INCIDENCIA DEL CONSUMO DE COCAÍNA Y OPIOIDES EN EL EMBARAZO.....	285
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	286





## **10.1 PACIENTES Y MÉTODOS**

### **10.1.1 DESARROLLO DEL ESTUDIO**

Entre abril y junio de 2007 se ha invitado a participar en este estudio a 97 mujeres embarazadas atendidas en el Complejo Hospitalario Xeral Cies de Vigo. A éstas se les ha explicado el objetivo y el modo de proceder del estudio en consultas externas y/o ingreso hospitalario. Todas aceptaron participar en el estudio y firmaron un consentimiento informado (Figura 10.1). El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de ensayos clínicos de Galicia.

Las mujeres incluidas en este estudio fueron entrevistadas en base a un protocolo previamente establecido (Figuras 10.2-10.4) en el que se incluían datos maternos tales como: edad, antecedentes personales, historia obstétrico-ginecológica, hábitos tóxicos declarados, consumo de fármacos, complicaciones durante la gestación, etc. Un protocolo similar ha sido empleado para la obtención de datos del recién nacido (Figura 10.5) como: semana en que tuvo lugar el parto, características del mismo, Apgar, necesidad de reanimación, datos antropométricos, exploración física, necesidad de ingreso, NAS, etc. Estos datos han sido obtenidos de la historia clínica del recién nacido.

<p style="text-align: center;"><b><u>CONSENTIMIENTO INFORMADO</u></b></p> <p style="text-align: center;"><b>ANÁLISIS DE DROGAS DE ABUSO EN MADRES GESTANTES A PARTIR DE MUESTRAS ANALIZADAS MEDIANTE TÉCNICAS DE CROMATOGRFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA MASAS E INFLUENCIA DEL CONSUMO EN LA GESTACIÓN Y EL RECIÉN NACIDO</b></p> <p>Dña _____ en calidad de madre del niño _____ con DNI nº _____ y domicilio en _____</p> <p>en nombre propio y ante testigo D/Dña _____</p> <p>MANIFIESTO que:</p> <p>He sido informado por el Dr/Dra _____ del Servicio de PEDIATRÍA del Complejo Hospitalario de Vigo de la existencia de un estudio sobre análisis toxicológico en muestras de vello pubiano materno, meconio y orina. Estos estudios se hacen por protocolo de un proyecto de investigación. He sido informada de que la obtención de dichas muestras no supone riesgo de infección ni de otra índole para el recién nacido ni para la madre. Los resultados de los análisis que se realizan son confidenciales, anónimos y gozan de la misma protección legal aplicable con carácter general a todos los datos clínicos del paciente (L.O. 15/99 de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal).</p> <p>Habiendo sido informada de lo anterior manifiesto mi conformidad con que sean recogidas y posteriormente procesadas y analizadas las muestras de vello púbico que se me ha rasurado así como la primera deposición meconial de hijo/a y la orina si procediese.</p> <p>Vigo, a ____ de _____ de _____</p> <table border="0" style="width: 100%;"><tr><td style="width: 33%; text-align: center;">La Madre</td><td style="width: 33%; text-align: center;">El Testigo</td><td style="width: 33%; text-align: center;">El Médico</td></tr></table>			La Madre	El Testigo	El Médico
La Madre	El Testigo	El Médico			

**Figura 10.1.** Modelo de consentimiento informado entregado a las gestantes que aceptan participar en el estudio.

**PROTOCOLO DE RECOGIDA DE DATOS MATERNOS**

- Edad: \_\_\_\_\_
- Domicilio: ☐ Urbano ☐ Rural. Municipio: \_\_\_\_\_
- Estudios: ☐ Primarios ☐ Secundarios ☐ Universitarios.
- Profesión: \_\_\_\_\_
- Estado civil: ☐ Casada ☐ Soltera ☐ Divorciada.
- Hª de fertilidad: G/P/A (espontáneo o IVE): \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
- Datos del padre:
  - o Profesión: \_\_\_\_\_
  - o Hábitos tóxicos: \_\_\_\_\_
- Antecedentes familiares: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
- Antecedentes personales: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
- Enfermedades de transmisión sexual: \_\_\_\_\_
- Embarazo controlado: ☐ NO ☐ SI. Centro: \_\_\_\_\_
- Serologías: VIH: \_\_\_\_\_ VHB: \_\_\_\_\_ VHC: \_\_\_\_\_ CMV: \_\_\_\_\_ Sífilis: \_\_\_\_\_  
Toxo: \_\_\_\_\_ Rubéola: \_\_\_\_\_ VEB: \_\_\_\_\_ VHS: \_\_\_\_\_ VVZ: \_\_\_\_\_  
VIH +: Embarazo controlado por la Unidad de VIH: ☐ NO ☐ SI.  
Tratamiento con Zidovudina: ☐ NO ☐ SI.

Página 1 de 3

**Figura 10.2.** Protocolo de recogida de datos maternos (Página 1).

- Consumo durante el embarazo:
  - o Hábitos tóxicos:
    - Niega consumo: ☐ NO ☐ SI
    - Tabaquismo: ☐ <10 cigarrillos/día ☐ 10-20 ☐ >1 paquete/día.
    - Alcohol: ☐ Esporádico ☐ Fin de semana ☐ Diario. Cantidad: \_\_\_\_\_
    - Cannabis: ☐ NO ☐ SI
    - Cocaína: ☐ NO ☐ SI
    - Drogas de diseño: ☐ NO ☐ SI
    - ADVP: \_\_\_\_\_
    - Metadona: ☐ No ☐ SI. Dosis: \_\_\_\_\_
  - o Trimestre: ☐ Primero ☐ Segundo ☐ Tercero.
  - o Inicio: ☐ Antes ☐ Durante.
  - o Frecuencia: ☐ Esporádico ☐ Habitual.
- Consumo previo al embarazo:
  - o Tiempo o edad desde el inicio del consumo: \_\_\_\_\_
  - o Tipo de droga: ☐ Ninguna ☐ Tabaco ☐ Alcohol ☐ Cannabis ☐ Cocaína  
☐ Drogas de diseño ☐ ADVP ☐ Metadona.

**Figura 10.3.** Protocolo de recogida de datos maternos (Página 2).

- Tratamiento farmacológico recibido durante la gestación: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

- Complicaciones/ ingresos durante el embarazo: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

- *Screening* de tóxicos en orina:

o Gestación: ☐ Negativo ☐ Positivo: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

o Postparto: ☐ Negativo ☐ Positivo: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Página 3 de 3

**Figura 10.4.** Protocolo de recogida de datos maternos (Página 3).

**PROTOCOLO DE RECOGIDA DE DATOS DEL RECIÉN NACIDO**

- Edad gestacional: \_\_\_\_ semanas
- PRN: \_\_\_\_ gr      PC: \_\_\_\_ cm      Longitud: \_\_\_\_ cm.
- Sexo: \_\_\_\_\_
- Cultivo del tercer trimestre: \_\_\_\_\_
- Modalidad de parto: ☐ Eutócico ☐ Instrumental ☐ Cesárea. Motivo de la cesárea: \_\_\_\_\_
- Sufrimiento fetal: \_\_\_\_\_
- Apgar: \_\_\_\_\_
- Reanimación: ☐ Superficial ☐ O<sub>2</sub>+ambú ☐ Intubación.
- Ingreso en UCI: ☐ NO ☐ SI. Motivo: \_\_\_\_\_
- Datos relevantes de la explotación física: \_\_\_\_\_
- Screening de tóxicos en orina: ☐ Negativo ☐ Positivo \_\_\_\_\_
- Clínica del síndrome de abstinencia: ☐ No ☐ Si: ☐ Leve ☐ Moderado ☐ Severo  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
- Días de ingreso: \_\_\_\_\_
- Tratamiento farmacológico del síndrome de abstinencia: ☐ NO ☐ SI: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
- Secuelas a corto plazo: \_\_\_\_\_
- Serologías al nacimiento: \_\_\_\_\_

**Figura 10.5.** Protocolo de recogida de datos del recién nacido (Página 1).

### **10.1.2 TAMAÑO MUESTRAL**

Del total de consentimientos se han excluido del estudio a 7 parejas madre-recién nacido, 6 por no disponer de la muestra materna o por ser ésta insuficiente para realizar el análisis y 1 por no poder disponer del meconio del recién nacido. Por lo tanto, el número final de parejas incluidas en el estudio fue de 90.

### **10.1.3 POBLACIÓN ESTUDIADA**

La población estudiada incluyó a mujeres del área urbana de Vigo y de las parroquias limítrofes (área rural) con un nivel socioeconómico medio. Ninguna de las mujeres incluidas en el estudio era inmigrante. La edad de estas gestantes estaba comprendida entre los 19 y los 42 años, con una edad media de 32 años. Ninguna admitió consumo crónico ni esporádico de COC y/o HER durante la gestación.

### **10.1.4 TIPO DE MUESTRAS ANALIZADAS**

#### ***10.1.4.1 VELLO PÚBLICO MATERNO***

Se recogieron muestras de vello púbico de las mujeres gestantes que aceptaron participar en el estudio. Éstas fueron obtenidas a partir del rasurado del parto gracias a la colaboración de las auxiliares clínicas de la sala de partos.

Estas muestras fueron introducidas en bolsas plásticas para su traslado al Servicio de Toxicología del IUML de Santiago, en donde fueron adecuadamente identificadas y almacenadas a temperatura ambiente hasta su análisis.

#### ***10.1.4.2 MECONIO DEL RECIÉN NACIDO***

Las muestras de meconio fueron recogidas del pañal de los recién nacidos incluidos en el estudio durante las primeras 24 horas de vida. Su traslado al laboratorio se realizó en botes plásticos convenientemente introducidos en neveras. En el laboratorio, las muestras fueron adecuadamente identificadas y almacenadas a una temperatura de -20°C hasta su análisis.

### **10.1.5 DETERMINACIÓN DE COCAÍNA Y/O OPIOIDES EN MUESTRAS DE VELLO PÚBLICO MATERNO Y MECONIO**

Para la determinación de COC, BE, COD, MOR y 6-MAM en las muestras de vello púbico materno y meconio del recién nacido ha sido realizado un *screening* previo mediante la técnica ELISA.

Para las muestras de pelo se ha empleado un método previamente estandarizado en la Università Cattolica del Sacro Cuore durante mi estancia predoctoral en Roma. Aplicando esta técnica a 48 muestras de pelo y comparando los resultados con los obtenidos mediante un método de LC-MS/MS, previamente validado en dicho laboratorio, se ha observado una sensibilidad del 89,5% y una especificidad del 100% para la técnica ELISA<sup>1</sup>.

El *screening* de las muestras de vello púbico fue realizado al extracto de pelo obtenido por sonicación del mismo durante 4 horas con 1 mL de agua:ácido fórmico 0,1% a temperatura ambiente. El *screening* de las muestras de meconio fue realizado al extracto metanólico obtenido por agitación y posterior centrifugación del mismo con 2 mL de metanol.

Los resultados de *screening* positivos para la BE y/o la MOR fueron confirmados y cuantificados utilizando los métodos GC-MS descritos en los capítulo 7 y 9 (segunda parte) para las muestras de vello púbico y meconio, respectivamente.



## 10.2 RESULTADOS

Los resultados de confirmación mediante GC-MS de las muestras de vello púbico y de meconio del recién nacido con *screening* positivo se muestran en la Tabla 10.2.

**Tabla 10.1.** Resultados GC-MS de las muestras con *screening* positivo.

	Concentración vello púbico materno (ng/mg)					Concentración meconio (ng/g)				
	COC	BE	COD	MOR	6-MAM	COC	BE	COD	MOR	6-MAM
<b>1</b>	<LOD	0	<LOD	0	0,564	0	0	<LOD	<LOD	0
<b>2</b>	0,582	0	0	0	0	0	0	0	<LOD	0
<b>3</b>	0,565	0	0	0	0	0	0	0	<LOD	0
<b>4</b>	0	0	0	7,347	0	0	0	0	24,34	0
<b>5</b>	0	0	<LOD	0	0	0	0	45	0	0
<b>6</b>	45,41	18,72	0	0	0	2363	3854	0	0	0
<b>7</b>	0,741	0,632	1,523	0	0	10,74	16,57	5,558	<LOD	0
<b>8</b>	0	0	0,518	0	0	0	0	0	0	0
<b>9</b>	0,874	0,724	0,853	4,906	0	185	611	144	2483	0
<b>10</b>	1,328	0,793	0	0	0	53,31	51,72	0	<LOD	0

## 10.3 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

### 10.3.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO BÁSICO

#### 10.3.1.1 MATRIZ DE DATOS

En base a los resultados obtenidos mediante el análisis de GC-MS se ha realizado una matriz de datos (Tabla 10.2) con el fin de establecer dos tipos de correlación: correlación entre los cinco analitos y correlación entre las dos muestras. En cada columna de esta matriz se ha representado una variable. Las variables con las que hemos trabajado son 10: concentración de COC en la madre, COC (M); concentración de COC en el recién nacido, COC (RN); concentración de BE en la madre, BE (M); concentración BE en el recién nacido, BE (RN); concentración de COD en la madre, COD (M); concentración de COD en el recién nacido, COD (RN); concentración de MOR en la madre, MOR (M); concentración MOR en el recién nacido, MOR (RN); concentración de 6-MAM en la madre, 6-MAM (M) y concentración 6-MAM en el recién nacido, 6-MAM (RN). Todas estas concentraciones han sido expresadas en ng/mg. En cada una de las filas de la matriz se han representado los resultados GC-MS positivos a alguno de los compuestos estudiados

en alguna de las matrices analizadas. Cuando el resultado GC-MS fue <LOD o 0, en la matriz de datos se ha indicado el valor del LOD correspondiente, pues los valores 0 son anulados por el programa, por lo que no se podrían establecer las correlaciones.

**Tabla 10.2.** Matriz de datos.

	COC (M)	COC (RN)	BE (M)	BE (RN)	COD (M)	COD (RN)	MOR (M)	MOR (RN)	6- MAM (M)	6- MAM (RN)
<b>1</b>	0,040	0,005	0,040	0,010	0,020	0,005	0,040	0,010	0,564	0,010
<b>2</b>	0,582	0,005	0,040	0,010	0,020	0,005	0,040	0,010	0,050	0,010
<b>3</b>	0,565	0,005	0,040	0,010	0,020	0,005	0,040	0,010	0,050	0,010
<b>4</b>	0,040	0,005	0,040	0,010	0,020	0,005	7,347	0,024	0,050	0,010
<b>5</b>	0,040	0,005	0,040	0,010	0,020	0,045	0,040	0,010	0,050	0,010
<b>6</b>	45,41	2,363	18,72	3,854	0,020	0,005	0,040	0,010	0,050	0,010
<b>7</b>	0,741	0,011	0,632	0,017	1,523	0,001	0,040	0,010	0,050	0,010
<b>8</b>	0,040	0,005	0,040	0,010	0,518	0,005	0,040	0,010	0,050	0,010
<b>9</b>	0,874	0,185	0,724	0,611	0,853	0,144	4,906	2,483	0,050	0,010
<b>10</b>	1,328	0,053	0,793	0,052	0,020	0,005	0,040	0,010	0,050	0,010

### **10.3.1.2 PRETRATAMIENTO DE LOS DATOS**

Nuevamente ha sido necesario homogenizar los datos para conferir la misma importancia o peso a cada una de las variables. El pretratamiento de datos usado en este estudio ha sido el mismo que en el Capítulo 8, la transformación rango medio y valor central. La matriz de datos normalizada se puede observar en la Tabla 10.3.

**Tabla 10.3.** Matriz de datos normalizada.

	COC (M)	COC (RN)	BE (M)	BE (RN)	COD (M)	COD (RN)	MOR (M)	MOR (RN)	6- MAM (M)	6- MAM (RN)
<b>1</b>	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-0,94	-1,00	-1,00	1,00	0,00
<b>2</b>	-0,98	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-0,94	-1,00	-1,00	-1,00	0,00
<b>3</b>	-0,98	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-0,94	-1,00	-1,00	-1,00	0,00
<b>4</b>	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-0,94	1,00	-0,99	-1,00	0,00
<b>5</b>	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-0,38	-1,00	-1,00	-1,00	0,00
<b>6</b>	1,00	1,00	1,00	1,00	-1,00	-0,94	-1,00	-1,00	-1,00	0,00
<b>7</b>	-0,97	-0,99	-0,94	-1,00	1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	0,00
<b>8</b>	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-0,34	-0,94	-1,00	-1,00	-1,00	0,00
<b>9</b>	-0,94	-0,85	-0,93	-0,69	0,11	1,00	0,33	1,00	-1,00	0,00
<b>10</b>	1,00	-0,96	-0,92	-0,98	-1,00	-0,94	-1,00	-1,00	1,00	0,00

### 10.3.1.3 MATRIZ DE CORRELACIÓN

Una vez normalizados los datos se ha construido una matriz de correlaciones cuadrada (Tabla 10.4), usando el programa Statistics, y se ha comprobado numéricamente qué variables han aportado correlación numérica ( $\geq 0,70$ ).

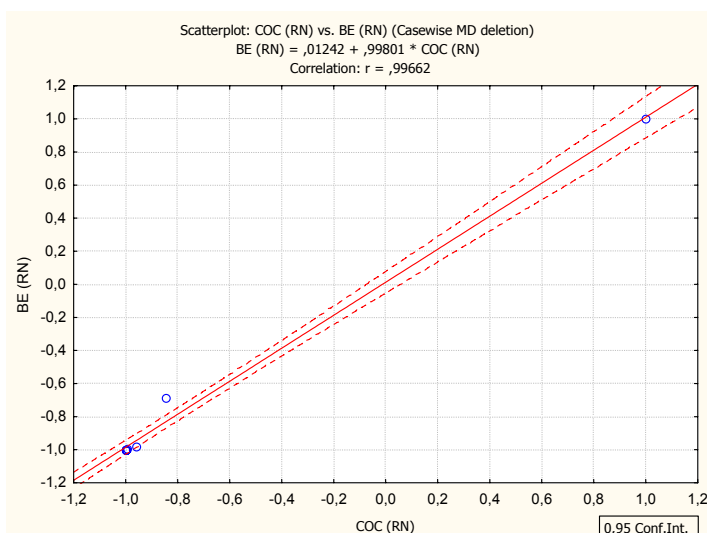
**Tabla 10.4.** Matriz de correlaciones.

[illegible]

Podemos observar en la tabla que para la concentración de 6-MAM en el recién nacido no se ha establecido correlación alguna debido a que ésta ha sido negativa en todos los casos.

#### 10.3.1.3.1 CORRELACIÓN COC-BE Y COD-MOR-6-MAM

La COC y la BE se correlacionan bien en la madre y en el recién nacido, con coeficientes de correlación para el recién nacido de 1 y para la madre de 0,69 (Figuras 10.6 y 10.7, respectivamente).



**Figura 10.6.** Correlación COC (RN)-BE (RN).

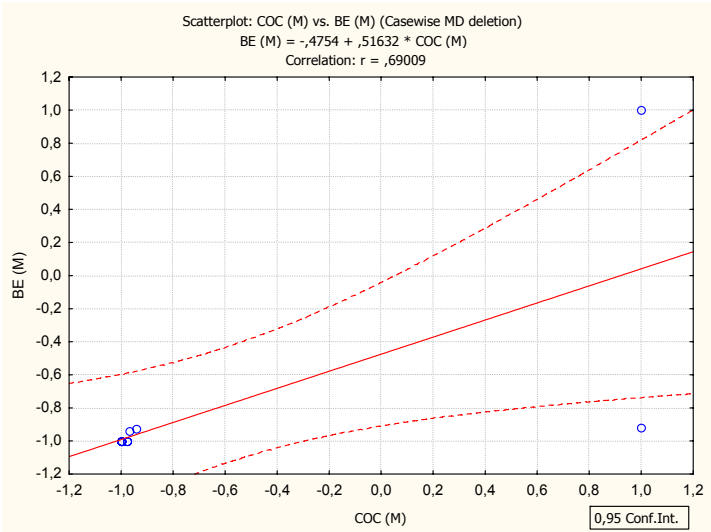


Figura 10.7. Correlación COC (M)-BE (M).

Para los opioides estudiados solamente se ha encontrado correlación para la COD y la MOR en el recién nacido (0,96; Figura 10.8).

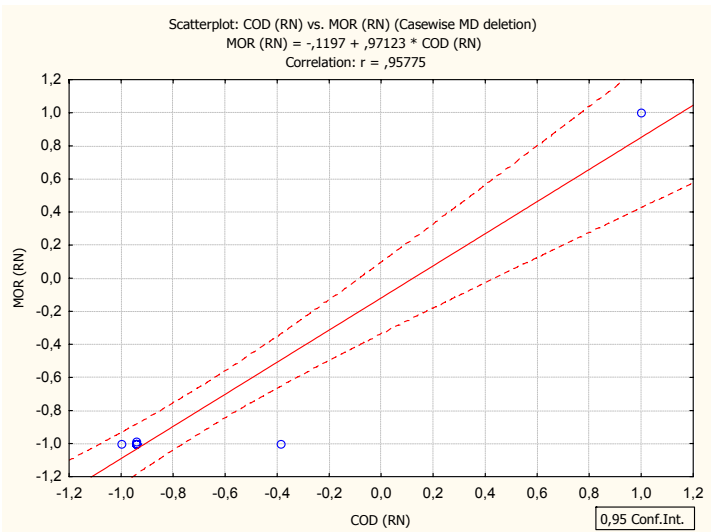
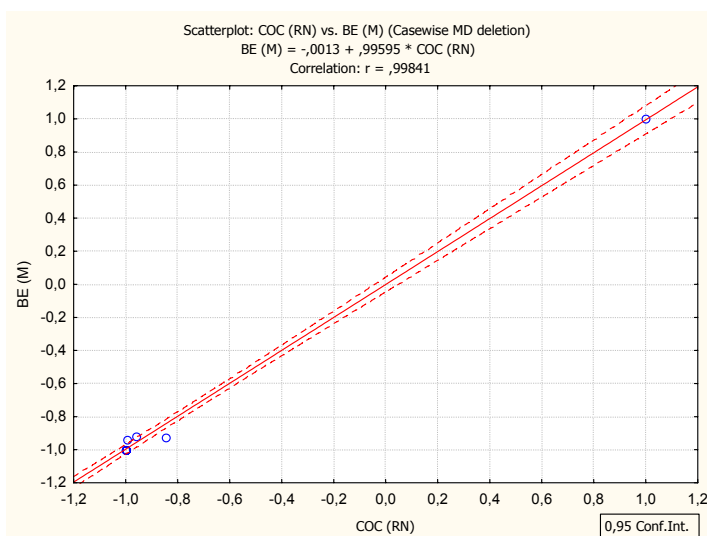


Figura 10.8. Correlación COD (RN)-MOR (RN).

### 10.3.1.3.2 CORRELACIÓN MADRE-RECIÉN NACIDO

El vello púbico materno y el meconio del recién nacido se correlacionan bien en la COC y en la BE. Sin embargo se observa una mejor correlación para la BE (M)-COC (RN) (1; Figura 10.9) y la BE (M)-BE (RN) (0,99; Figura 10.10), y correlaciones ligeramente más bajas para la COC (M)-COC (RN) (0,67; Figura 10.11) y la COC (M)-BE (RN) (0,65; Figura 10.12). Para los opioides estudiados no se han podido establecer correlaciones entre la madre y el recién nacido.



**Figura 10.9.** Correlación BE (M)-COC (RN).

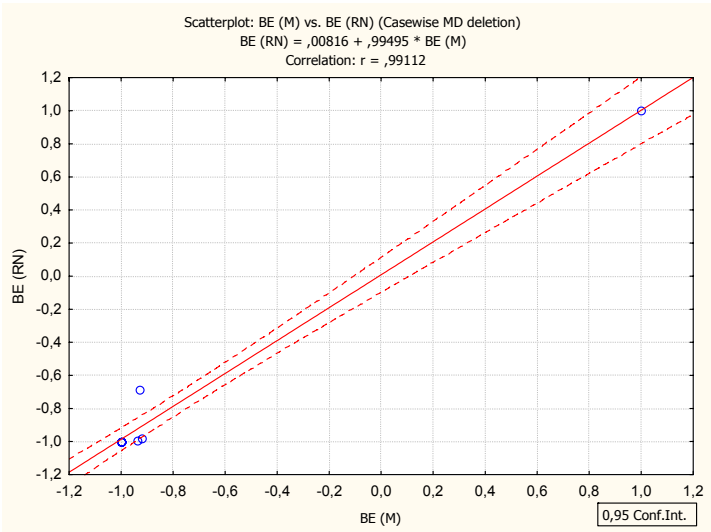


Figura 10.10. Correlación BE (M)-BE (RN).

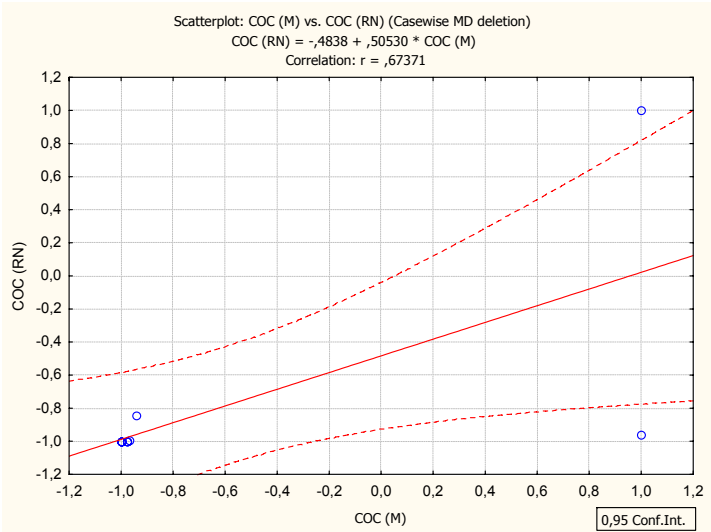
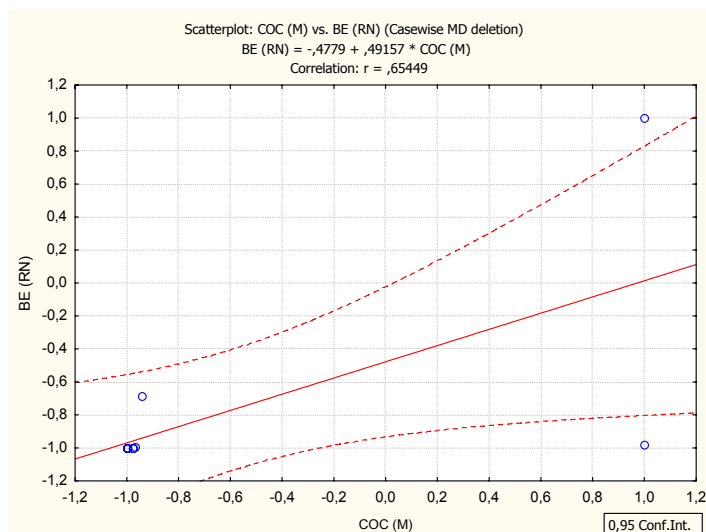


Figura 10.11. Correlación COC (M)-COC (RN).





**Figura 10.12.** Correlación COC (M)-BE (RN).

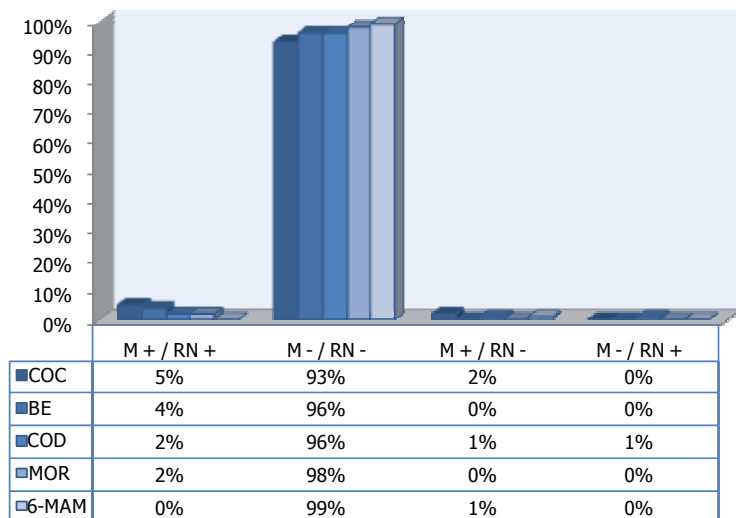
### 10.3.2 RELACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS POSITIVOS Y NEGATIVOS EN LA MADRE Y EL RECIÉN NACIDO

Se ha establecido también una relación entre las muestras de vello púbico materno y meconio del recién nacido en función de si los resultados de *screening* y/o confirmación han sido positivos o negativos para cada uno de los analitos estudiados. En este caso se han incluido en el estudio todas las muestras analizadas y se ha establecido la relación que se observa en la Tabla 10.5.

**Tabla 10.5.** Relación de positivos y negativos en la madre y en el recién nacido.

	COC	BE	COD	MOR	6-MAM
<b>M + / RN +</b>	4/4	4/4	2/2	2/2	0/0
<b>M - / RN -</b>	84/84	86/86	86/86	88/88	89/89
<b>M + / RN -</b>	2/2	0/0	1/1	0/0	1/1
<b>M - / RN +</b>	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0

En la Figura 10.13 se puede observar la representación gráfica de la distribución porcentual de los cinco compuestos analizados en función de la relación de positivos y negativos en la madre y el recién nacido.



**Figura 10.13.** Distribución porcentual de los cinco analitos estudiados en función de la relación de positivos y negativos en la madre y el recién nacido.

### 10.3.3 RELACIÓN ENTRE EL CONSUMO MATERNO Y LAS POSIBLES ALTERACIONES EN EL RECIÉN NACIDO

No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a Apgar y necesidad de reanimación en los neonatos incluidos en el estudio. Ninguno de ellos desarrolló NAS.

Solamente en un recién nacido, el identificado con el número 6, se han observado alteraciones clínicas. Éstas fueron: cir, nacimiento mediante cesárea urgente y bajo peso.

#### **10.3.4 INCIDENCIA DEL CONSUMO DE COCAÍNA Y OPIOIDES EN EL EMBARAZO**

La incidencia del consumo de COC y opioides observada en este estudio en cada una de las matrices analizadas se resume en la siguiente tabla.

**Tabla 10.6.** Incidencia del consumo de COC y opioides en el embarazo.

	Vello púbico	Meconio
<b>COC</b>	4%	2%
<b>OPIOIDES</b>	3%	2%
<b>COC+OPIOIDES</b>	2%	2%

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. López P, Martello S, Bermejo AM, De Vincenzi E, Taberero MJ, Chiarotti M. Validation of screening (by ELISA) and confirmation (by LC-MS/MS) methods for cocaine in hair after an easy extraction. Anal Bioanal Chem (En prensa).

# Anexos



## Validation of ELISA screening and LC–MS/MS confirmation methods for cocaine in hair after simple extraction

P. López · S. Martello · A. M. Bermejo ·  
Eleonora De Vincenzi · M. J. Tabernero · M. Chiarotti

Received: 30 November 2009 / Revised: 23 March 2010 / Accepted: 23 March 2010  
© Springer-Verlag 2010

**Abstract** This article describes an easy and innovative extraction procedure for cocaine and its primary metabolite, benzoylecgonine (BE), from hair consisting of sonication with H<sub>2</sub>O/0.1% formic acid for 4 h. The same extract was used for screening with an enzyme-linked immunoassay (ELISA) and confirmation by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS). For the ELISA screening test a cutoff of 0.5 ng/mg was used according to the Society of Hair Testing recommendations. LC–MS/MS limits of detection (LODs) were established to be 10 pg/mg and 1 pg/mg for cocaine and BE, respectively. Linearity was obtained over a range of 0.2–5 ng/mg for BE (target analyte) in the ELISA screening test, while in the LC–MS/MS method the range was 0.10–10 ng/mg for cocaine and 0.01–10 ng/mg for BE. Intra- and interbatch coefficients of variation and mean relative errors were less than 20% for all analytes and concentrations studied. The validated ELISA and LC–MS/MS methods were applied to 48 hair samples and the results of both methods were compared; ELISA demonstrated a sensitivity and specificity of 89.2% and 10.8%.

**Keywords** Hair · Cocaine · Benzoylecgonine · ELISA · LC/MS/MS

P. López · A. M. Bermejo · M. J. Tabernero  
Institute of Legal Medicine, Faculty of Medicine,  
University of Santiago de Compostela,  
San Francisco, s/n,  
15782 Santiago de Compostela, Spain

S. Martello (✉) · E. De Vincenzi · M. Chiarotti  
Institute of Legal Medicine, Faculty of Medicine,  
Catholic University of the Sacred Heart,  
Largo Francesco Vito 1,  
00168 Rome, Italy  
e-mail: simona.martello@rm.unicatt.it

### Introduction

The importance of hair analysis in drug testing has rapidly grown in recent years. Nowadays hair analysis is routinely used as a powerful tool for the detection of illicit drug use. As a biological matrix, hair offers particular advantages: it can be easily obtained without pain, it is not easily adulterated and, due to its stability, it can be stored and transported without requiring specific precautions. Moreover, drugs are capable of surviving for hundreds of years in the hair shaft under favorable conditions (protected from light and humidity), so the window for drug detection is very long, providing a retrospective history of an individual's drug use if multisectional analysis is used. After an initial lag time of approximately 8 h for drug entering hair from sweat or between 5 and 10 days for drugs incorporated into hair from blood, the slow growth of hair at about 1 cm per month gives a window of detection equal to the length of the hair.

A critical problem of traditional hair analysis is the decontamination of the hair prior to analysis. Cleaning external contamination from the hair sample is necessary for two reasons. First, residues of hair care products (wax, shampoo, hair sprays) as well as sweat, sebum, and dust typically present on hair may increase analytical noise/background. Second, drugs can adhere from the individual's environment thus potentially contributing to incorrect test results. This type of environmental contamination is quite common for individuals involved with illegal drugs. Therefore, the first wash solution should be tested or stored for subsequent analysis to exclude the possibility that a positive analytical result originated from this type of environmental contamination [1].

In a controlled study Kintz et al. [2] found that cocaine concentration in hair ranged from 0.5 to 216.5 ng/mg,

benzoylecgonine (BE) from 0.1 to 33.7 ng/mg, methyl-ecgonine from 0.1 to 12.8 ng/mg, cocaethylene from 0.1 to 10.3 ng/mg, norcocaine from 0.00 to 0.70 ng/mg, and anhydroecgonine from 0.2 to 2.4 ng/mg. In view of these results cocaine should be a primarily target compound in hair.

A correct procedure for toxicological analysis, especially in forensic and epidemiological studies, involves two different steps: screening and confirmation. Usually an immunoassay followed by a chromatographic method is performed: the first step allows for a preliminary monitoring of a large number of samples in a reduced period of time, while the second step provides the required specificity by giving structural information [1].

Although the first hair analysis for drugs was performed by radioimmunoassay (RIA) [3], these immunoassays have not gained general acceptance because they are available for a limited number of illicit drugs (or metabolites), and are not generally specific. Immunoassay drug testing kits originally developed for urine are of insufficient sensitivity for use in hair extracts [4]. Nevertheless, in recent years some enzyme-linked immunoassay (ELISA) tests for opiates [5, 6], cocaine [6], amphetamines [7], benzodiazepines [8], and methadone [9] have been developed and proven to be sufficiently sensitive for use in hair analysis.

The most popular method to confirm screening results is gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC–MS) [6, 10–13]. The combination of liquid chromatography and mass spectrometry (LC–MS) is useful for hair analysis because it eliminates the GC-dependent complications of volatility, stability, and derivatization. An efficient use of LC in hair analysis is only possible with coupled tandem MS/MS because this biological matrix contains low levels of drugs. A number of papers using LC–MS/MS in hair analysis have been published including detection of nicotine [14–16], ethylglucuronide [17], cocaine and its metabolites [14–16, 18, 19], opiates [14–16, 18–20], benzodiazepines [14–16, 18, 19, 21, 22], and amphetamines [14–16, 18, 19].

The aim of this study was to validate an easy and innovative extraction procedure for cocaine and its primary metabolite, BE, from hair specimens and to perform analysis of the same extract by an ELISA screening test, followed by a confirmation method, LC–MS/MS.

## Experimental

### Samples

Forty-eight hair samples were obtained from people ranging from 20 to 40 years of age; 25 samples were from known

drug abusers; 13 were from people whose drug use status was unknown; 10 samples were from volunteers (3 female and 7 male) who declared to have never used cocaine or other illicit drugs. None of the samples were chemically colored. All samples were collected from the vertex posterior area as close as possible to the scalp. The proximal and distal ends were carefully identified. Sectional analysis was performed with hair samples longer than 10 cm. The hair samples were cut into segments of 2 cm, corresponding to a 2-month growth period. All samples were stored at room temperature prior to analysis.

### Chemical and reagents

All solvents used were of high-performance liquid chromatography (HPLC)-grade obtained from Merck (Darmstadt, Germany). LC/MS water Chromasolv and formic acid were also purchased from Riedel-de Haën Sigma-Aldrich (Seelze, Germany). Tween® 80 was purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Cocaine, BE, and their respective deuterium-labelled analogs, cocaine-*d*<sub>3</sub> and BE-*d*<sub>3</sub>, were purchased from LCG Promochem (Teddington, UK). Cozart® ELISA Cocaine Metabolite Forensic Kit was purchased from Cozart® (Oxfordshire, UK). Each kit contains an anti-cocaine metabolite coated plate (anti-cocaine metabolite monoclonal antibody immobilized on a polystyrene plate supplied in dry form), enzyme conjugate (cocaine metabolite derivative labelled with horseradish peroxidase > 0.1% (v/v) and diluted in a protein matrix with stabilizers), wash buffer (0.1% surfactant), substrate solution (< 0.05% 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB), stop solution (1 mol/L sulfuric acid), negative calibrator (protein matrix negative for BE), and positive calibrators (protein matrix containing 10, 50, and 300 ng/mL BE).

### Preparation and conservation of the stock solutions

Stock standard solutions at a concentration of 1 mg/mL were stored in acetonitrile for cocaine and in methanol for BE in volumetric glassware. Working solutions were prepared by dilution of the stock standards with methanol and stored at –20°C until analysis.

### Preparation and conservation of the calibrating samples

Calibrating samples for ELISA analysis were prepared spiking blank hair samples (20–40 mg) with 0.0, 0.2, 0.5, 1, 2, and 5 ng/mg of BE. For LC–MS/MS analysis calibrating samples were prepared by spiking blank hair samples with 0.0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.5, 5.0, and 10.0 ng/mg for cocaine and 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, and 10.0 ng/mg for BE.



**Table 1** LC gradient elution program

Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)	Solvent C (%)
0.00–6.00	70.00	10.00	20.00
7.00–12.00	50.00	10.00	40.00
13.00–20.00	30.00	10.00	60.00
21.00–30.00	70.00	10.00	20.00

*Solvent A* 0.01% formic acid, *solvent B* methanol, *solvent C* acetonitrile

#### Preparation of the samples

##### Decontamination

The decontamination procedure was performed by washing twice in 5 mL of a 0.1% solution of Tween® 80 for 10 min, and rinsing twice with 5 mL of distilled water to eliminate the external contamination. The second wash solution was tested to exclude external contamination.

After drying, each sample was cut into 1-mm segments with clean surgical scissors and then 20–40 mg of hair was weighted into a labelled vial.

##### Extraction

The weighed hair samples were prepared for analysis by sonication for 4 h in 0.4 mL of H<sub>2</sub>O/formic acid at room temperature. A 200-μL aliquot was used in the ELISA screening test and the other aliquot for the LC–MS/MS confirmation.

For LC–MS/MS analysis, deuterated internal standards (IS) were used; 0.5 ng/mg of cocaine-*d*<sub>3</sub> and 0.05 ng/mg of BE-*d*<sub>3</sub> were added into the 200-μL aliquot which was then vortexed before injection of 10 μL into the LC–MS/MS system.

##### ELISA analysis

The instrumentation used for ELISA analysis was a DSX™ Fully Automated System (Cozart®, Oxfordshire, UK).

Ten-μL of hair extracts (or calibrating samples) was added to each well of the antibody-coated microtitre plate. After addition of 100 μL of working enzyme conjugate to each well, incubation at room temperature was performed for 30 min. The plate was then washed four times with 350 μL wash buffer using a plate washer to remove any excess of enzyme material. After these washes, 100 μL of substrate solution was added to each well and incubated for an additional 30 min. Finally, 100 μL of stop solution was added to each well to terminate the reaction, and the absorbance was read at 450 nm using a microplate reader within 15 min.

#### LC–MS/MS analysis

Cocaine and BE in hair were measured by using a ThermoFisher Surveyor® LC pump coupled with an LXQ ion trap mass spectrometer, using electrospray ionization with positive ion polarity mode (ThermoFisher, San Jose, USA). The sample injection was performed by using a ThermoFisher Surveyor® Autosampler AS. All data were acquired and interpreted by using XCalibur™ software, version 2.0.

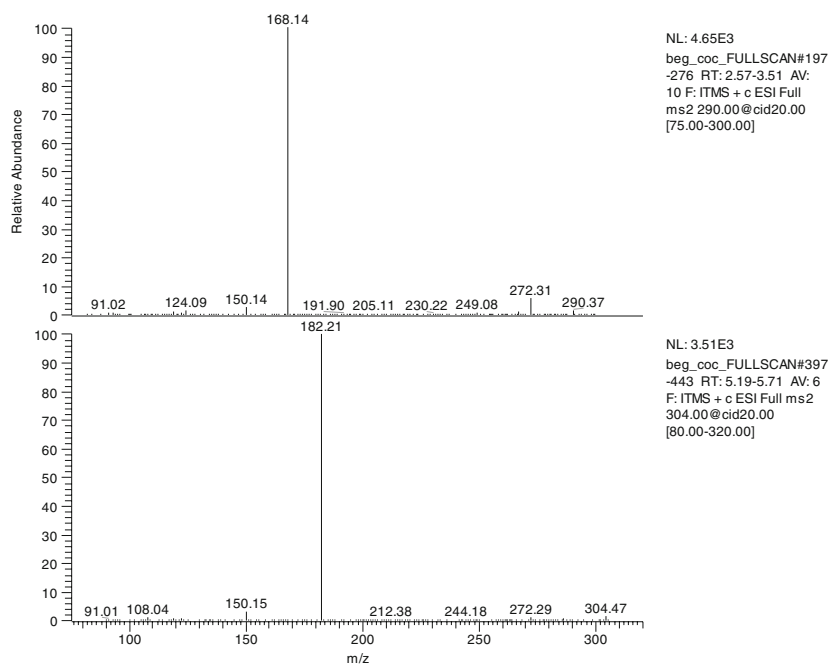
Chromatographic separation was performed on a Synergi Polar RP column (150×2.0 mm, 4 μm) protected by a guard column with identical packing material (4×2.0 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA). The gradient elution program is reported in Table 1. All analytes were identified in positive ion mode; the source parameters are reported in Table 2. Identification and quantification was based on selected reaction monitoring (SRM) with the following MS/MS transitions: *m/z* 304→150–182 for cocaine (*m/z* 307→153–185 for cocaine-*d*<sub>3</sub>) and *m/z* 290→150–168 for BE (*m/z* 293→153–171 for benzoylecgonine-*d*<sub>3</sub>). The ion *m/z* 182 and 185 for cocaine and cocaine-*d*<sub>3</sub>, and the ion *m/z* 168 and 171 for BE and BE-*d*<sub>3</sub> were chosen for the quantification, according to the fragmentation pattern reported in Fig. 1.

#### Validation of the methods

The method has been submitted to full validation which was performed according to the recommendations of the US Food and Drug Administration (FDA) [23] and International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) [24]. The parameters that were analyzed in both methods are: calibration curve, precision, accuracy, sensitivity, and specificity. For the LC–MS/MS method the matrix effect and the deuterated compound stability were also analyzed.

**Table 2** LC–MS/MS source parameters

Parameters	Value
Spray voltage (kV)	5
Sheath gas pressure (arbitrary units)	20
Aux gas pressure (arbitrary units)	8
Spray current (μA)	0.8
Isolation width	2
Capillary temperature (°C)	300
Capillary offset (V)	17
Tube lens offset (V)	55



**Fig. 1** Full MS/MS spectra of BE (a) and cocaine (b)

Cross-reactivity of the ELISA method was not measured because percentages of cross-reactivity are reported by the manufacturer in each kit.

#### Calibration curve

Linearity was performed by calculation of the regression line expressed by the correlation coefficient ( $R^2$ ). BE calibration was done over a maximum concentration range from 0.2 to 5 ng/mg for ELISA, and for LC-MS the range was 0.10–10 ng/mg for cocaine and 0.01–10 ng/mg for BE. In both methods, five aliquots were performed for each level.

**Table 3** ELISA validation results for BE

ng/mg	CV (%)		Mean relative error (%)	
	Intraday	Interday	Intraday	Interday
0.2	9.771	14.27	3.532	19.27
2	4.936	8.336	4.943	5.756
5	5.421	0.232	6.110	1.840

$$A=0.150\pm0.037, B=0.5432\pm0.022, R^2=0.995\pm0.003$$

#### Precision and accuracy

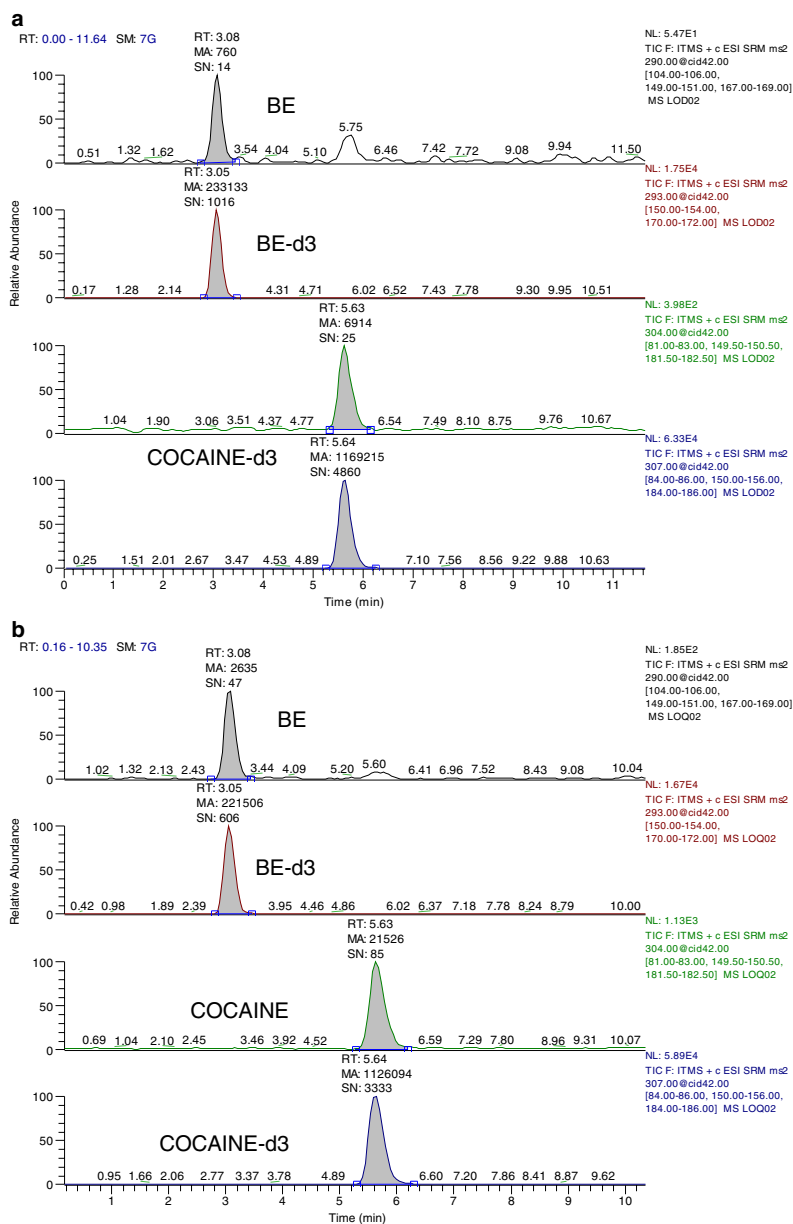
Precision and accuracy were evaluated over the linear dynamic range at three different concentrations: lower limit of quantification (LLOQ), intermediate concentration, and upper limit of quantification (ULOQ). Intraday precision and accuracy were assessed with five determinations per

**Table 4** LC–MS/MS validation results for cocaine and BE

	ng/mg	CV (%)		Mean relative error (%)	
		Intraday	Interday	Intraday	Interday
Cocaine <sup>a</sup>	0.10	3.4	2.9	8.7	8.6
	0.5	1.8	2	4.9	5.9
	10	0.68	0.8	0.3	1.2
BE <sup>b</sup>	0.01	8.9	7.8	0.5	4.7
	0.05	6.5	1.7	2.3	5.6
	10	3.9	3.3	4.9	6.9

$$^a y=5.4908x+0.3014, R^2=0.99, s=0.003-0.02$$

$$^b y=8.3984x+0.3473, R^2=0.99, s=0.0004-0.005$$



**Fig. 2** BE and cocaine chromatograms of LOD (a) and LOQ (b)

concentration in 1 day, while interday precision and accuracy were evaluated by five determinations per concentration on different days.

Precision (coefficient of variation, CV) and accuracy (mean relative error, MRE) were calculated by applying Eqs. 1 and 2, respectively:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}_i} \cdot 100 \quad (1)$$

$$MRE = \frac{\bar{x}_i - x}{x} \cdot 100 \quad (2)$$

$s$  being the standard deviation,  $x_i$  the mean of the observed concentrations, and  $x$  the real concentration.

According to FDA criteria [23], precision and accuracy determined at each concentration level studied should not exceed 15% except for the LLOQ, where it should not deviate by more than 20%.

#### Sensitivity and specificity of the ELISA method

The sensitivity and specificity were calculated by applying Eqs. 3 and 4, respectively, which requires the total number

of true positives (TP), true negatives (TN), false positives (FP), and false negatives (FN) to be counted.

$$Sensitivity = \frac{TP \cdot 100}{TP + FN} \quad (3)$$

$$Specificity = \frac{TN \cdot 100}{TN + FP} \quad (4)$$

For evaluating these parameters, the validated ELISA and LC–MS/MS methods for the extraction of cocaine and BE from hair were applied to 48 hair specimens: 10 samples from non drug abusers, 25 from known drug abusers, and 13 from people whose drug use status was unknown. All the specimens were analyzed for cocaine and BE, according to the developed and validated methods, and the screening results were compared with those obtained by applying the validated LC–MS/MS method.

#### Sensitivity and specificity of the LC–MS/MS method

The sensitivity of the LC–MS/MS method was analyzed by calculating the limit of detection (LOD) and limit of

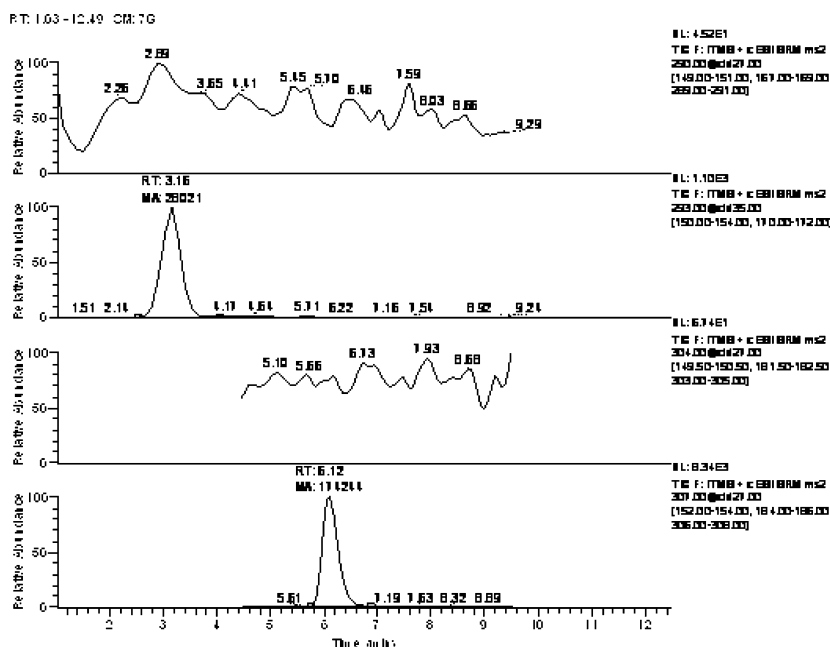


Fig. 3 Typical chromatogram of a volunteer's (blank) hair sample

quantification (LOQ) defined as the lowest concentration with a signal-to-noise ratio (S/N) of at least 3 and 10, respectively, and with an acceptable precision and accuracy. Both parameters were determined empirically by analysis of a series of decreasing concentrations of the drug-fortified hair in three replicates.

For determining the specificity of the LC–MS/MS method a total of four blank hair samples from volunteers who had never consumed cocaine were extracted and analyzed for assessment of potential interferences from endogenous substances. The apparent response at the retention times of the analytes under investigation was compared with the response of analytes at the lower limit of quantification (LLOQ).

#### Matrix effect

These parameters were assessed by following the recommendations of Matuszewski et al. [25]. Matrix effect is defined as the effect of co-eluting residual matrix component on the ionization of the target analytes and is a limitation commonly associated with LC–MS analysis. Precision and/or accuracy of the method could be compromised by an enhancement or

suppression of analyte response due to matrix effects. Matrix effect was calculated at 0.5, 1.0, and 5.0 ng/mg for cocaine and 0.05, 1.0, and 5.0 ng/mg for BE by comparing average peak areas in four different blank hair eluates fortified before sonication with those obtained with analytes prepared in mobile phase at the same concentrations. The matrix effect was calculated by Eq. 5:

$$ME = \frac{B}{A} \cdot 100 \quad (5)$$

$A$  being the average peak areas of the analytes prepared in mobile phase, and  $B$  the average peak areas of the eluates fortified before sonication.

#### Deuterated compound stability

Before performing the validation of the LC–MS/MS method, the addition of deuterated analogs (cocaine- $d_3$  and BE- $d_3$ ) to the sample was studied. Deuterated compound stability during sonication was evaluated by processing two sets of blank hair spiked at three levels of deuterated. The first set was spiked before sonication and the second set after sonication.

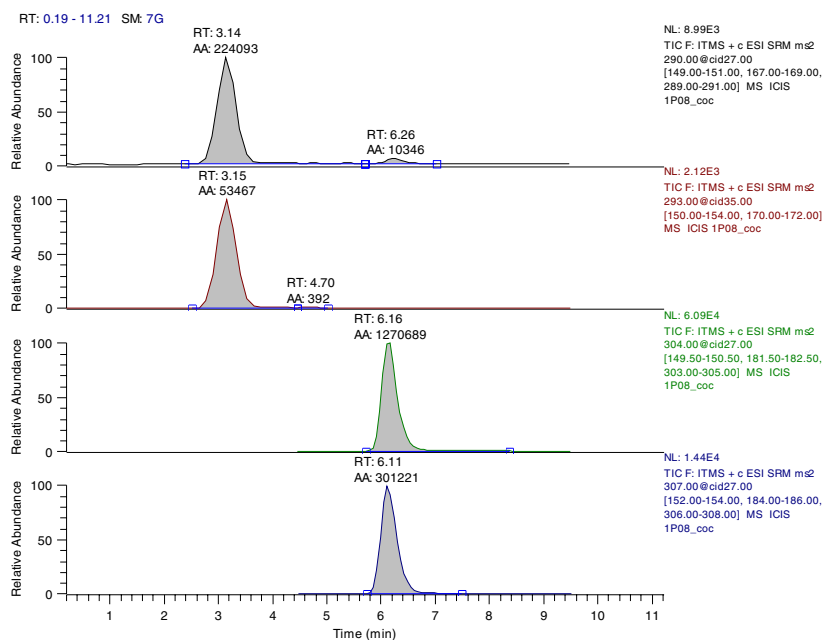


Fig. 4 Typical chromatogram of a drug abuser's hair sample

## Results and discussion

### Calibration curve

Linear calibration curves were obtained with both methods for cocaine and BE with correlation coefficients higher than 0.99 in all cases. Tables 3 and 4 show an average of the linear lines obtained with the ELISA and LC–MS/MS methods, respectively, and an average of the correlation coefficients with their respective standard deviations.

### Precision and accuracy

The precision and accuracy of the ELISA and LC–MS/MS methods are summarized in Tables 3 and 4, respectively. ELISA precision for BE ranges from 0.232 to 14.27%, while accuracy ranges from 1.840 to 19.27%. On the other hand, LC–MS/MS precision ranges from 0.68 to 3.4% for cocaine and from 3.3 to 8.9 for BE. LC–MS/MS accuracy ranges from 0.3 to 8.7% for cocaine and from 0.5 to 6.9% for BE.

Precision and accuracy at reported concentrations in both methods satisfactorily meet the international established acceptance criteria [23].

### Sensitivity and specificity of the LC–MS/MS method

**Sensitivity** LOD and LOQ of cocaine were 0.01 and 0.05 ng/mg, while LOD and LOQ for BE were 0.001 and 0.005 ng/mg. In view of cocaine and BE concentrations usually found in hair [2] and the cutoff concentrations mandated by the Society of Hair Testing (SOHT) [26], the LOQ value provides sufficient sensitivity for forensic application.

Figure 2 shows the chromatograms of LOD and LOQ for cocaine (a) and for BE (b). The LOD and the LOQ obtained with experimental analyses were low enough for the toxicological purposes.

**Specificity** Figure 3 reports a typical chromatogram obtained for a blank hair sample (volunteer) analysis. No target analyte interferences were detected at cocaine and BE retention times during LC–MS/MS analysis of 10 blank hair samples. Specificity of the method was achieved by using deuterated internal standard (cocaine- $d_3$  and BE- $d_3$ ) by combination of retention time, precursor and product ions in MS/MS spectra.

### Sensitivity and specificity of the ELISA method

Figure 4 reports a typical LC–MS/MS chromatogram obtained for a drug abuser's hair sample analysis, and Table 5 shows the ELISA and LC–MS/MS results for cocaine and BE in the 38 hair specimens analyzed.

**Table 5** ELISA and LC–MS/MS method results

Sample	ELISA	LC–MS/MS	
	BE ng/mg	Cocaine ng/mg	BE ng/mg
1 (blank)	< 0.001	< 0.01	< 0.001
2 (blank)	< 0.001	< 0.01	< 0.001
3 (blank)	< 0.001	< 0.01	< 0.001
4 (blank)	< 0.001	< 0.01	< 0.001
5 (blank)	< 0.001	< 0.01	< 0.001
6 (blank)	< 0.001	< 0.01	< 0.001
7 (blank)	< 0.001	< 0.01	< 0.001
8 (blank)	< 0.001	< 0.01	< 0.001
9 (blank)	< 0.001	< 0.01	< 0.001
10 (blank)	< 0.001	< 0.01	< 0.001
11 (abuser)	2.4	3.1	1.8
12 (abuser)	2.7	5.0	1.2
13 (abuser)	13.4	18.6	8.5
14 (abuser)	5.5	11.4	5.2
15 (abuser)	4.4	7.7	6.3
16 (abuser)	7.2	25.6	25
17 (abuser)	5.2	6.3	3.2
18 (abuser)	9.7	20.3	31.0
19 (abuser)	12.3	10.6	4.2
20 (abuser)	4.4	6.7	2.9
21 (abuser)	2.2	4.2	4.2
22 (abuser)	8.2	9.5	7.9
23 (abuser)	5.3	3.1	6.0
24 (abuser)	7.2	25.0	12.0
25 (abuser)	7.2	2.1	1.2
26 (abuser)	15.4	28.5	17.5
27 (abuser)	8.2	9.7	6.3
28 (abuser)	6.9	4.2	10.0
29 (abuser)	6.3	5.3	13.0
30 (abuser)	11.4	18.6	22.0
31 (abuser)	0.3	1.8	0.2
32 (abuser)	2.9	3.6	1.0
33 (abuser)	2.5	3.1	1.2
34 (abuser)	5.3	4.0	2.8
35 (abuser)	6.8	4.9	12.0
36 (unknown)	3.1	2.7	2.3
37 (unknown)	0.3	0.2	0.1
38 (unknown)	0.5	0.5	0.2
39 (unknown)	2.1	1.5	0.6
40 (unknown)	0.4	0.5	0.2
41 (unknown)	0.8	0.3	0.5
42 (unknown)	1.2	4.6	2.9
43 (unknown)	0.6	1.7	0.6
44 (unknown)	2.6	4.1	1.3
45 (unknown)	0.4	0.1	0.1
46 (unknown)	0.2	0.2	0.1
47 (unknown)	0.7	0.5	0.5
48 (unknown)	1.0	0.9	0.2

There are currently no approved or proposed guidelines for cocaine cutoffs in hair, but the SOHT[26] guidelines recommend a cocaine level of 0.5 ng/mg to produce a positive result in immunochemical tests; and for chromatographic tests, an LOQ  $\leq$  0.5 ng/mg for cocaine and  $\leq$  0.05 ng/mg for other related compounds, such as BE. Therefore, the performance of the ELISA was assessed at a cutoff of 0.5 ng/mg in comparison with the LC–MS/MS method. Using this cutoff, and taking into account the LOQ values of the chromatographic method (0.5 ng/mg for cocaine and 0.05 ng/mg for BE), only 4 negative ELISA results (samples 31, 40, 45, and 46) were not confirmed by LC–MS/MS (4 FN), 34 positive ELISA results were confirmed by LC–MS/MS (34 TP), and 10 negative ELISA results were confirmed by LC–MS/MS (10 TN). No FP has been found (0 FP). According to this, the sensitivity and specificity of the ELISA method versus LC–MS/MS were 89.5% and 100%, respectively.

#### Matrix effect and deuterated compound stability

An ionization suppression is present (cocaine ME 98%, BE ME 96%). The matrix effect for both compounds has no effect on the quantification.

No deuterated compound degradation during sample sonication was observed when comparing blank hair samples spiked before and after the sonication step.

#### Conclusions

Both methods fulfilled the analytical validation criteria, reducing analysis time significantly and showing good sensitivity for forensic purposes. The quantification was performed in LC–MS/MS after internal standard addition and direct injection of hair samples. Traditionally, methods such as GC–MS used solvent that was incompatible with the ELISA technique, whereas our LC–MS/MS method permits a simultaneous extraction of hair matrix by sonication of hair samples with an acidified water solution compatible with the ELISA technique.

The extraction procedure based on the decontamination and sonication of hair is an innovative and valid alternative to the traditional extraction method. This type of procedure permits the simultaneous analysis of many specimens and the elimination of tedious and time-consuming sample preparation, thus reducing workload and analysis time.

The validated ELISA method was well suited for screening of cocaine in hair. The immunological tests are simple, rapid, and required only a small quantity of samples. Moreover, the use of the same extraction procedure in ELISA and LC–MS/MS simplifies the method and permits the posterior confirmation without requiring additional samples.

#### References

- Segura J, Stramesi C, Redón A, Ventura M, Sanchez CJ, González G, San L, Montagna M (1999) Immunological screening of drugs of abuse and gas chromatographic-mass spectrometric confirmation of opiates and cocaine in hair. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 724(1):9–21
- Kintz P, Cirimele V, Sengler C, Mangin P (1995) Testing human hair and urine for anhydroecgoninemethylester, a pyrolysis product of cocaine. *J Anal Toxicol* 19(6):479–482
- Baumgartner AM, Jones PF, Baumgartner WA, Black CT (1979) Radioimmunoassay of hair for determining opiate-abuse histories. *J Nucl Med* 20(7):748–752
- Pragst F, Balikova MA (2006) State of art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clin Chim Acta* 370(1–2):17–49
- Cooper G, Wilson L, Reid C, Baldwin D, Hand C, Spiehler V (2003) Validation of the Cozart microplate ELISA for detection of opiates in hair. *J Anal Toxicol* 27(8):581–586
- Lachenmeier K, Musshoff F, Madea B (2006) Determination of opiates and cocaine in hair using automated enzyme immunoassay screening methodologies followed by gas chromatographic–mass spectrometric (GC–MS) confirmation. *Forensic Sci Int* 159(2–3):189–199
- Han E, Miller E, Lee J, Park Y, Lim M, Chung H, Wylie FM, Oliver JS (2006) Validation of the immunoanalysis microplate ELISA for the detection of methamphetamine in hair. *J Anal Toxicol* 30(6):380–385
- Miller EI, Wylie FM, Oliver JS (2006) Detection of benzodiazepines in hair using ELISA and LC–ESI–MS–MS. *J Anal Toxicol* 30(7):441–448
- Cooper G, Wilson L, Reid C, Baldwin D, Hand C, Spiehler V (2005) Comparison of Cozart microplate ELISA and GC–MS detection of methadone and metabolites in human hair. *J Anal Toxicol* 29(7):678–681
- Skender L, Karacić V, Brcić I, Bagarić A (2002) Quantitative determination of amphetamines, cocaine, and opiates in human hair by gas chromatography–mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 125(2–3):120–126
- Montagna M, Stramesi C, Vignali C, Groppi A, Poletтини A (2000) Simultaneous hair testing for opiates, cocaine and metabolites by GC–MS: a survey of applicants for driving licenses with a history of drug use. *Forensic Sci Int* 107(1–3):157–167
- Míguez-Framil M, Moreda-Piñeiro A, Bermejo-Barrera P, López P, Tabernero MJ, Bermejo AM (2007) Improvements on enzymatic hydrolysis of human hair for illicit drug determination by gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem* 79(22):8564–8570
- Cordero R, Paterson S (2007) Simultaneous quantification of opiates, amphetamines, cocaine and metabolites and diazepam and metabolite in a single hair sample using GC–MS. *J Chromatography B Analyt Technol Biomed Life Sci* 850(1–2):423–431
- Kronstrand R, Nyström I, Strandberg J, Druid H (2004) Screening for drugs of abuse in hair with ion spray LC–MS–MS. *Forensic Sci Int* 145(2–3):183–190
- Hegstad S, Khiabani HZ, Kristoffersen L, Kunø N, Lobmaier PP, Christophersen AS (2008) Drug screening of hair by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 32(5):364–372
- Moeller MR, Fey P, Wenning R (1993) Simultaneous determination of drugs of abuse (opiates, cocaine and amphetamine) in human hair by GC/MS and its application to a methadone treatment program. *Forensic Sci Int* 63(1–3):185–206
- Janda I, Weinmann W, Kuehnle T, Lahode M, Alt A (2002) Determination of ethyl glucuronide in human hair by SPE and LC–MS/MS. *Forensic Sci Int* 128(1–2):59–65

18. Miller EI, Wylie FM, Oliver JS (2008) Simultaneous detection and quantification of amphetamines, diazepam and its metabolites, cocaine and its metabolites, and opiates in hair by LC-ESI-MS-MS using a single extraction method. *J Anal Toxicol* 32(7):457–469
19. Bogusz MJ (2000) Liquid chromatography-mass spectrometry as routine method in forensic sciences: a proof of maturity. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 748(1):3–19
20. Kelly T, Doble P, Dawson M (2005) Chiral analysis of methadone and its major metabolites (EDDP and EMDP) by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 814(2):315–323
21. Kronstrand R, Nyström I, Josefsson M, Hodgins S (2002) Segmental ion spray LC-MS-MS analysis of benzodiazepines in hair of psychiatric patients. *J Anal Toxicol* 26(7):479–484
22. Toyo'oka T, Kumaki Y, Kanbori M, Kato M, Nakahara Y (2003) Determination of hypnotic benzodiazepines (alprazolam, estazolam, and midazolam) and their metabolites in rat hair and plasma by reversed-phase liquid-chromatography with electrospray ionization mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 30(6):1773–1787
23. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research (2001) Guidance for industry: bioanalytical method validation, Rockville, MD. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>. Accessed 21 Jan 2010
24. International Conference on Harmonization Tripartite Guideline (2005) ICH topic Q2, Validation of analytical procedures: text and methodology, Geneva. <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>. Accessed 21 Jan 2010
25. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM (2003) Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem* 75(13):3019–3030
26. Society of Hair Testing (2004) Recommendations for hair testing in forensic cases. *Forensic Sci Int* 145(2–3):83–84



# Capítulo

# 11

## Discusión



## Capítulo 11. Discusión

<b>11.1</b>	DETERMINACIÓN DE COCAÍNA Y OPIOIDES EN PELO POR GC-MS.....	291
<b>11.1.1</b>	HIDRÓLISIS.....	291
<b>11.1.2</b>	PROCESO DE EXTRACCIÓN .....	294
<b>11.1.3</b>	DERIVATIZACIÓN .....	295
<b>11.1.4</b>	METODOLOGÍA ANALÍTICA .....	297
<b>11.1.5</b>	ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE VALIDACIÓN .....	298
<b>11.1.6</b>	APLICACIÓN A CASOS REALES .....	299
<b>11.2</b>	APLICACIÓN A MUESTRAS DE VELLO PÚBLICO MATERNO Y CABELLO DEL RECIÉN NACIDO.....	300
<b>11.2.1</b>	RESULTADOS .....	300
<b>11.2.2</b>	ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS .....	302
<b>11.2.2.1</b>	ANÁLISIS ESTADÍSTICO BÁSICO .....	302
<b>11.2.2.2</b>	RELACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS POSITIVOS Y NEGATIVOS EN LA MADRE Y EL RECIÉN NACIDO .....	303
<b>11.2.2.3</b>	RELACIÓN ENTRE EL CONSUMO MATERNO Y LAS POSIBLES ALTERACIONES EN EL RECIÉN NACIDO.....	303
<b>11.2.2.4</b>	INCIDENCIA DEL CONSUMO DE COCAÍNA Y OPIOIDES EN EL EMBARAZO.....	304
<b>11.3</b>	DETERMINACIÓN DE COCAÍNA Y OPIOIDES EN MECONIO POR GC-MS.....	305
<b>11.3.1</b>	TRATAMIENTO PREVIO DE LA MUESTRA.....	305
<b>11.3.2</b>	PROCESO DE EXTRACCIÓN .....	305
<b>11.3.3</b>	ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE VALIDACIÓN .....	306
<b>11.3.4</b>	APLICACIÓN A CASOS REALES .....	307
<b>11.3.4.1</b>	EXTRACCIÓN CON WATERS OASIS® HLB.....	307
<b>11.3.4.2</b>	EXTRACCIÓN CON BOND ELUT CERTIFY® .....	308
<b>11.4</b>	APLICACIÓN A MUESTRAS DE VELLO PÚBLICO MATERNO Y MECONIO.....	309
<b>11.4.1</b>	RESULTADOS .....	309
<b>11.4.2</b>	ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS .....	310
<b>11.4.2.1</b>	ANÁLISIS ESTADÍSTICO BÁSICO .....	310
<b>11.4.2.2</b>	RELACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS POSITIVOS Y NEGATIVOS EN LA MADRE Y EL RECIÉN NACIDO .....	311

<b>11.4.2.3</b>	RELACIÓN ENTRE EL CONSUMO MATERNO Y LAS POSIBLES ALTERACIONES EN EL RECIÉN NACIDO .....	312
<b>11.4.2.4</b>	INCIDENCIA DEL CONSUMO DE COCAÍNA Y OPIOIDES EN EL EMBARAZO.....	312
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	314

Tal como se ha señalado en el Apartado de Justificación y Objetivos, la principal finalidad de esta Tesis Doctoral ha sido demostrar la posibilidad de utilización de muestras biológicas alternativas para la detección del consumo de drogas durante el periodo de gestación. En base a esto hemos juzgado de interés desarrollar un método analítico para determinar COC y opioides dado que, en la práctica, la asociación de estas drogas es muy frecuente.

Las matrices biológicas que se han utilizado en esta Tesis fueron el pelo (vello púbico y cabello) y el meconio. Por una parte, el vello púbico y/o el cabello materno pueden informarnos de si ha existido consumo por parte de la mujer embarazada, sin embargo, no se tiene la certeza de que este consumo se haya producido durante la gestación. Las matrices que sí pueden informarnos sobre consumo en este periodo son el cabello del recién nacido y el meconio. A través del análisis del cabello del recién nacido la ventana de detección se establece en las últimas 16 semanas de gestación, ya que es a partir de la vigésima semana del embarazo cuando el cabello del recién nacido empieza a formarse. Con el fin de ampliar dicha ventana se ha empleado el meconio que empieza a formarse entre la duodécima y decimosexta semana de gestación, por lo que la ventana de detección se amplía a las últimas 20-24 semanas del embarazo.

A continuación se discutirán aquellos aspectos más relevantes de los métodos analíticos desarrollados y su aplicación a muestras reales.

## **11.1 DETERMINACIÓN DE COCAÍNA Y OPIOIDES EN PELO POR GC-MS**

### **11.1.1 HIDRÓLISIS**

Una fase crítica del análisis de las muestras de pelo es el aislamiento de los analitos de la matriz queratínica en la cual están atrapados. En la literatura se describen diversos métodos para el aislamiento de las drogas ilícitas de la matriz queratínica. Éstos se basan en el uso de metanol, ácidos acuosos, o soluciones tampón, en digestiones alcalinas con hidróxido sódico acuoso y en digestiones enzimáticas<sup>1-3</sup>. La SFE también ha sido utilizada para extraer las drogas ilícitas de las muestras de pelo<sup>2,4-6</sup>, sin embargo, según Pragst y Balikova<sup>2</sup> este método es poco utilizado debido a su alto coste.

El uso de condiciones alcalinas drásticas, utilizando hidróxido sódico acuoso, conduce a una eficiente solubilización de las matrices queratínicas, sin embargo, estas condiciones se deben evitar a la hora de determinar compuestos inestables en condiciones alcalinas, como por ejemplo, la COC<sup>1</sup>. Del mismo modo, las soluciones acuosas ácidas también pueden hidrolizar algunos analitos, por ejemplo, la hidrólisis parcial de COC a BE o de 6-MAM a MOR<sup>2</sup>.

De acuerdo a los resultados del tercer ensayo de aptitud organizado por la SoHT (*Society of Hair Testing*)<sup>7</sup> la hidrólisis ácida puede ofrecer un mayor rendimiento para la COC y los opiáceos así como para sus metabolitos, en comparación con los rendimientos obtenidos utilizando hidrólisis enzimática o metanólica. Sin embargo, las conclusiones de este estudio no son totalmente fiables debido a la alta RSD.

Cuando es necesario aislar analitos de estabilidades diferentes bajo las mismas condiciones, lo más útil es realizar pretratamientos del pelo utilizando pHs moderados. En estos casos, son preferibles tratamientos previos de la muestra basados en extracciones con metanol o hidrólisis enzimática. El uso de metanol como disolvente ofrece la ventaja sobre los métodos de digestión enzimática de que se pueden realizar inyecciones directas en el GC sin realizar la limpieza de los extractos de pelo. Sin embargo, generalmente se obtienen recuperaciones incompletas del analito y formación de ésteres metílicos derivados<sup>2</sup>.

Los tratamientos basados en enzimas proteolíticas son muy útiles para la extracción de drogas ilícitas del pelo ya que al requerir condiciones de pH y temperatura moderadas, no tiene lugar la hidrólisis de los analitos. La hidrólisis enzimática consiste en la reducción de los puentes disulfuro de las queratinas bajo determinadas condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica. Después de la acción de la hidrólisis enzimática, una fracción variable del analito es liberada de la matriz del pelo y puede ser adecuadamente medido. La pronasa E y la proteinasa K son las enzimas más comúnmente utilizadas para la hidrólisis de proteínas del pelo<sup>1,2,8-11</sup>, aunque también ha sido utilizada una mezcla  $\alpha$ -glucuronidasa/arilsulfatasa<sup>12</sup>. Offidani y cols.<sup>8</sup> mejoraron la hidrólisis enzimática del cabello con DTT y dodecil sulfato sódico durante el tratamiento enzimático. La presencia de DTT aumenta el rendimiento de extracción del analito (COC) cuando el reactivo se incubaba con la muestra de cabello durante<sup>8,11</sup> o antes<sup>9,10</sup> de la hidrólisis enzimática.

Para la extracción de los opioides (COD, MOR y 6-MAM) y de la COC y su metabolito BE, se ha observado que los rendimientos de extracción son mayores cuando se utilizan hidrólisis enzimáticas que cuando se utiliza la hidrólisis alcalina o la extracción con metanol<sup>13</sup>. Por este motivo, en esta Tesis se ha decidido emplear la hidrólisis enzimática en el tratamiento previo de las muestras de pelo.

Sin embargo, una importante desventaja de la hidrólisis enzimática es el tiempo necesario para completar el proceso de hidrólisis, comúnmente en el rango de 6 a 24 h. Este hecho, junto con el uso de un método de limpieza eficiente, hace que la hidrólisis enzimática del pelo sea una metodología tediosa y laboriosa.

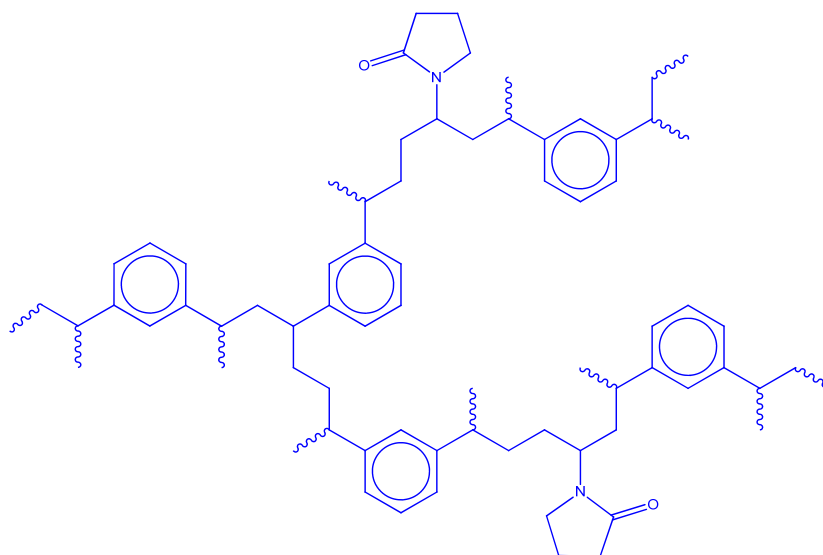
Actualmente este inconveniente ha sido solventado gracias a la aplicación de la energía de ultrasonidos al proceso de hidrólisis<sup>14</sup>, sin embargo, en el momento de la validación del método analítico para la determinación de COC, BE, COD, MOR y 6-MAM en las muestras pelo aún no había sido demostrada la aplicabilidad de la energía de ultrasonidos en la hidrólisis enzimática del pelo, por lo que la validación ha sido realizada por el método convencional.

Anteriormente, la energía de ultrasonidos había sido aplicada con éxito para acelerar la hidrólisis enzimática en materiales biológicos para la extracción de elementos traza y especies organometálicas, reduciendo el tiempo de hidrólisis a 30 min usando baños de ultrasonidos<sup>15</sup> y a 2 min usando sondas ultrasónicas<sup>16</sup>. Sin embargo la energía de ultrasonidos no había sido aplicada a la extracción de drogas ilícitas.

Las ondas de ultrasonido promueven un aumento de la presión y la temperatura debido al colapso de la burbuja (inducen procesos de cavitación). El colapso asimétrico de la cavidad cuando una fase sólida se encuentra inmersa en una fase líquida produce chorros de alta velocidad de líquido que impactan en la superficie del sólido<sup>17</sup>. Según lo propuesto por Wolf y cols.<sup>18</sup>, cuando se extraen metaloproteínas a partir de materiales biológicos bajo ondas de ultrasonido, estos impactos rompen las membranas celulares y el contenido citosólico es más fácilmente atacado por las enzimas, permitiendo un menor tiempo de pretratamiento<sup>15</sup>.

### 11.1.2 PROCESO DE EXTRACCIÓN

En el desarrollo de este método analítico se ensayaron distintos cartuchos de SPE con rellenos basados en sílica C<sub>18</sub> (Bond Elut Certify), rellenos de copolímero hidrofílico-lipofílico (Oasis HLB) y rellenos de intercambio catiónico (Oasis MCX). Los que dieron mejores resultados en términos de rendimiento y de obtención de extractos más “limpios” fueron los cartuchos Oasis HLB. Estos cartuchos están rellenos, como ya se ha mencionado en el Capítulo 7, por un copolímero macroporoso, poli-(divinilbenceno-co-N-vinilpirrolidona) (Figura 11.1) con balance hidrofílico-lipofílico. El monómero hidrofílico proporciona propiedades humectantes, lo que permite trabajar con el relleno seco sin pérdida de recuperación y de reproducibilidad. Por otro lado, el monómero lipofílico proporciona propiedades de fase reversa para la retención de los analitos, los cuales son retenidos en su forma no ionizada en este tipo de rellenos apolares. Además esta peculiar composición presenta una elevada resistencia a pHs extremos.



**Figura 11.1.** Estructura de la poli-(divinilbenceno-co-N-vinilpirrolidona).

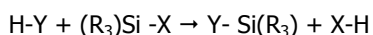


El pH de las muestras que eluyen a través de los cartuchos es de suma importancia y la recuperación depende de la forma ionizada o no ionizada de los analitos<sup>19</sup>. Por este motivo, la optimización de las distintas etapas de lavado y de elución de estos cartuchos ha sido realizada a partir del protocolo genérico de extracción, teniendo en cuenta las propiedades físico-químicas de los compuestos estudiados. Así, la carga de la muestra y el segundo lavado con un porcentaje de metanol del 20% fueron realizados a pH básico, el cual favorecía la retención de los analitos en los cartuchos. La elución fue realizada con metanol a pH ácido (metanol + 2% de ácido acético) favoreciendo de esta manera el paso de los analitos a su forma ionizada, la cual presentaba más afinidad por el solvente de elución que por el relleno del cartucho.

### 11.1.3 DERIVATIZACIÓN

En cromatografía de gases, en ocasiones es necesario derivatizar algunos compuestos, principalmente los que tienen grupos funcionales polares (hidrógenos activos), con el fin de mejorar su volatilidad, su estabilidad térmica y en algunos casos la sensibilidad en la detección.

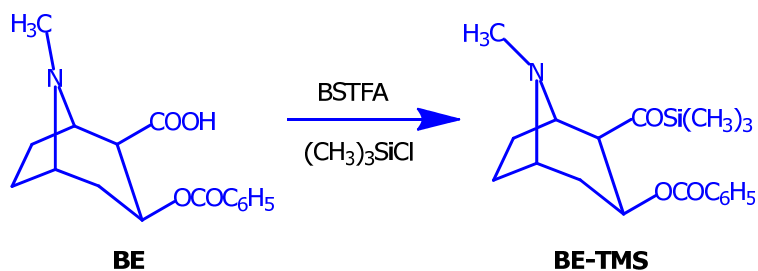
El proceso de derivatización empleado en esta Tesis ha sido la sililación. Ésta consiste en la sustitución de un hidrógeno activo de un grupo funcional por un grupo sililo, el cual está formado por un átomo de silicio trisustituido. El proceso de sililación de forma general se representa de la siguiente manera:



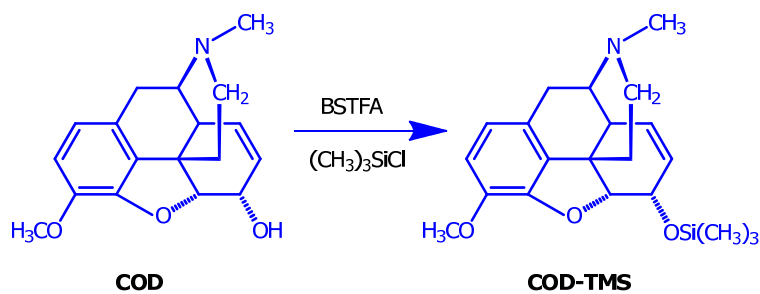
El reemplazamiento del hidrógeno activo por el grupo sililo produce efectos importantes en la molécula del soluto: (a) reduce su polaridad, (b) reduce la posibilidad de formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares y (c) aumenta la volatilidad y la estabilidad térmica.

Dado que las reacciones de sililación de los compuestos de interés en la muestra a analizar son reacciones lentas a temperatura ambiente, se ha elevado la temperatura a 100°C y se ha utilizado TMCS como catalizador. De este modo se ha conseguido acelerar la reacción sin provocar reacciones secundarias.

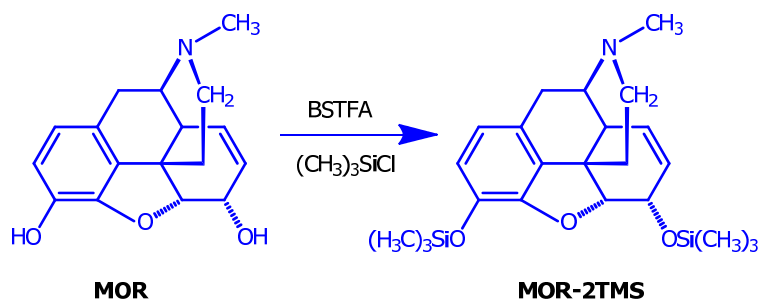
Las reacciones de sililación que han tenido lugar en los compuestos estudiados son las que a continuación se indican (Figuras 11.2-11.5).



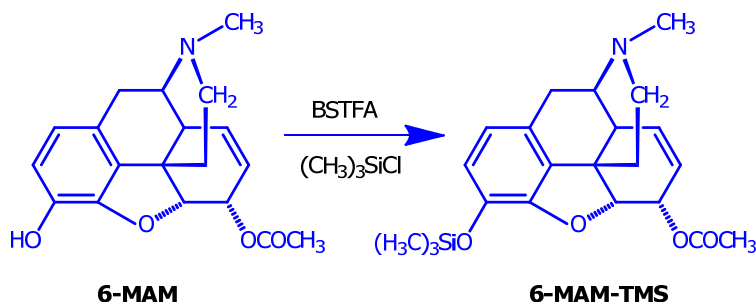
**Figura 11.2.** Reacción de sililación de la BE.



**Figura 11.3.** Reacción de sililación de la COD.



**Figura 11.4.** Reacción de sililación de la MOR.



**Figura 11.5.** Reacción de sililación de la 6-MAM.

En el caso de la COC, dado que en su estructura no existen hidrógenos activos, la reacción de sililación no ha tenido lugar. En la BE, la sililación se ha producido en el grupo ácido carboxílico y en los opioides en el grupo alcohol. En la MOR se ha producido una doble sililación debido a la presencia de dos grupos alcohol en su estructura.

#### 11.1.4 METODOLOGÍA ANALÍTICA

La GC-MS es una técnica analítica eficaz para la identificación y cuantificación de drogas en toxicología forense. Ésta y la LC-MS son las técnicas más utilizadas en la detección de COC y opioides en muestras de pelo para determinar el consumo durante el embarazo, tal como se ha indicado en el Capítulo 4. Esto se debe a que son técnicas altamente sensibles, requisito imprescindible en los análisis de pelo y meconio donde las concentraciones esperadas de los analitos son bajas.

En el método analítico desarrollado, la elección de los PI se realizó en base a la norma general que debe cumplir todo PI, esto es, debe poseer una elevada semejanza estructural con los analitos objeto de análisis, ya que de este modo todos los procesos que pueda sufrir la muestra hasta su análisis ocurrirán en la misma extensión tanto para los analitos como para el PI (dilución, extracción, etc.). Además también es importante que el PI seleccionado no se encuentre presente en la muestra a analizar. Por este motivo se decidió utilizar los PI deuterados, que presentan propiedades fisicoquímicas similares a los compuestos de interés y no se encuentran presentes en las muestras de pelo.

Para la separación cromatográfica de los analitos de interés se ensayaron distintos programas de temperaturas, consiguiendo una adecuada separación en menos de 17 minutos, con un tiempo total de análisis de 19 minutos.

### 11.1.5 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE VALIDACIÓN

Tal como se ha comentado en la validación de los métodos analíticos desarrollados en esta Tesis, ésta ha sido realizada según criterios recomendados en algunas revisiones y los establecidos por organismos estadounidenses e internacionales<sup>20-23</sup>.

Los parámetros de validación recomendados (selectividad, linealidad, límites, precisión intradía e interdía, exactitud intradía e interdía y rendimiento) fueron aplicados para los analitos estudiados.

El LOD observado para la COC, BE y MOR fue de 0,04 ng/mg, para la COD 0,02 ng/mg y para la 6-MAM 0,05 ng/mg. El LLOQ y el ULOQ fueron 0,5 y 20 ng/mg para todos los compuestos investigados.

En la mayoría de los trabajos publicados las sensibilidades obtenidas son menores a las del método propuesto<sup>24-36</sup>. Sin embargo, existen algunos métodos en la bibliografía que presentan sensibilidades iguales o superiores para alguno de los analitos, siendo inferiores para el resto<sup>37-40</sup>. Tan sólo se han encontrado ocho trabajos donde las sensibilidades igualan o mejoran a las obtenidas en el método propuesto en esta Tesis<sup>41-47</sup>. Cabe indicar que de estos métodos solamente tres<sup>45,46</sup> han sido totalmente validados, sin embargo, en ninguno de ellos han sido incluidos todos los analitos de interés.

En cuanto a los restantes parámetros de validación, el método analítico cumplió todos los criterios en relación con la selectividad, linealidad, precisión, exactitud y rendimiento. Por lo tanto, el método desarrollado en esta Tesis ha sido el primero completamente validado que permite la determinación simultánea de COC, BE, COD, MOR y 6-MAM en muestras de pelo mediante GC-MS.

### 11.1.6 APLICACIÓN A CASOS REALES

El método desarrollado ha sido aplicado a 20 casos reales recibidos en el Servicio de Toxicología del IUML de Santiago procedentes de consumidores de COC y/o HER (*screening* positivo a COC y/o MOR).

Las concentraciones de los casos positivos a COC oscilaron entre 0,10 y 93,8 ng/mg, con un valor medio de 10,1 ng/mg para la COC; y entre 0,19 y 55,7 ng/mg, con un valor medio de 5,65 ng/mg para la BE. En el caso de los positivos a los opioides en estudio, las concentraciones de COD oscilaron entre 0,29 y 5,11 ng/mg, con un valor medio de 2,14 ng/mg; para la MOR entre 0,61-31,1 ng/mg, con un valor medio de 9,02 ng/mg y para la 6-MAM entre 0,23 y 158 ng/mg, con un valor medio de 39,0 ng/mg. Estos niveles, que están en concordancia con los indicados en otros estudios (Véase Tabla 11.1), son muy variables, lo que pone de manifiesto la enorme variabilidad existente entre los individuos y que puede deberse a que se trate de consumidores esporádicos o crónicos (desarrollo de tolerancia) o a factores genéticos (toxicogenética).

**Tabla 11.1.** Revisión bibliográfica de los niveles de concentración hallados en muestras de pelo.

REFERENCIA	Concentración pelo (ng/mg)				
	COC	BE	COD	MOR	6-MAM
<b>Wang<sup>26</sup></b>	0,4-172,7	0,1-24,4	0,2-0,3	0,2-1,3	0,1-1,6
<b>Kintz<sup>29</sup></b>	0,4-78,4	0,0-36,3	0,1-19,6	0,2-27,1	0,0-84,3
<b>Gaillard<sup>30</sup></b>	0,9-242	0,3-71,3	0,1-11,5	0,4-44,6	0,7-131,2
<b>Cordero<sup>35</sup></b>	0,6-24,5	0,2-5,4	1,2-5,6	0,2-30	0,1-71,1
<b>Moeller<sup>37</sup></b>	0,2-8,3	0,1-2,5	0,2-1,7	0,4-4,1	1,2-10,4
<b>Montagna<sup>42</sup></b>	0,58-5,31	1,33-3,96	0,49-1,39	0,79-4,14	1,26-17,3
<b>Lachenmeir<sup>44</sup></b>	0,01-21,37	0-10,51	0-1,84	0,03-11,87	0,04-30,01

Es necesario señalar que en la mayoría de los casos analizados, las mayores concentraciones han sido obtenidas para la COC y la 6-MAM, lo cual nos lleva a pensar que ambos analitos son buenos marcadores del consumo de COC y HER, respectivamente. La BE también es considerada un buen marcador del consumo de COC en el pelo y así lo han reflejado en su estudio Katikaneni y cols.<sup>48</sup>. En cuanto a los indicadores del consumo de HER en el pelo, Iwersen y cols.<sup>49</sup> consideran que la MOR y la 6-MAM son los analitos idóneos para este fin, lo que concuerda con los datos obtenidos en este trabajo.

## 11.2 APLICACIÓN A MUESTRAS DE VELLO PÚBLICO MATERNO Y CABELLO DEL RECIÉN NACIDO

### 11.2.1 RESULTADOS

El método de determinación de COC y opioides en pelo fue aplicado a 77 muestras pareadas de vello púbico materno y cabello del recién nacido (60 de Obstetricia y 17 de Neonatología), recogidas entre Octubre de 2005 y Octubre de 2006 en el Complejo Hospitalario Xeral Cies de Vigo, tal como se ha indicado en el Capítulo 8.

El rango de concentraciones detectado mediante GC-MS en los casos positivos para cada uno de los analitos analizados en las dos poblaciones de estudio se resume en la siguiente tabla.

**Tabla 11.2.** Rango y valor medio de las concentraciones detectadas en cada una de las muestras.

Comp	Rango vello púbico (ng/mg)	Valor medio vello púbico (ng/mg)	Rango cabello (ng/mg)	Valor medio cabello (ng/mg)
<b>COC</b>	1,41-221	33,4	0,05-24,5	4,81
<b>BE</b>	0,61-85,1	13,1	0,40-6,03	2,02
<b>COD</b>	0,15-3,31	1,24	0	0
<b>MOR</b>	0,18-7,08	2,54	5,63	5,63
<b>6-MAM</b>	0,51-18,5	6,78	20,7	20,7

Estos resultados muestran una mayor concentración de COC en relación con la BE en ambas muestras y ambas poblaciones analizadas. Para los opioides, en todos los casos, la concentración de 6-MAM ha sido mayor que la concentración de MOR y ésta mayor que la concentración de COD. Estos resultados indican consumo de COC y HER, tal como se ha explicado anteriormente.

Además, también se puede observar que las concentraciones de los cinco analitos estudiados son más altas en las muestras de vello púbico materno que en las muestras de cabello del recién nacido.

Estudios similares realizados en el pelo materno y en el del recién nacido (Tabla 11.3) encontraron los mismos resultados, demostrando que en el pelo hay mayor concentración de los compuestos madre que de sus metabolitos y que además la concentración de las drogas y sus metabolitos es mayor en las muestras de pelo materno que en las de pelo del recién nacido.

**Tabla 11.3.** Revisión bibliográfica de los niveles de concentración hallados en muestras de pelo materno y del recién nacido.

Comp	Iwersen <sup>49</sup>		DiGregorio <sup>50</sup>		Vinner <sup>51</sup>	
	Rango pelo M (ng/mg)	Rango pelo M (ng/mg)	Rango pelo RN (ng/mg)	Rango pelo RN (ng/mg)	Rango pelo M (ng/mg)	Rango pelo RN (ng/mg)
<b>COC</b>	-	1,8-421	0,8-243,5	-	-	-
<b>BE</b>	-	1,3-183,6	0,8-55,4	-	-	-
<b>COD</b>	0,59-1,25	-	-	0	2,0-27,6	0
<b>MOR</b>	0,607-8,1	-	-	3-3,97	2,9-16,9	2,8-3,1
<b>6-MAM</b>	7,4-32,8	-	-	9,6-11,77	2,4-32,6	8,9-29

Es necesario indicar que los valores reflejados en esta tabla para las muestras maternas, se refieren a cabello y no a muestras de vello púbico. No se ha encontrado en la bibliografía ningún estudio donde se relacione el vello púbico materno con el cabello del recién nacido. Sin embargo, existen algunos estudios, como los llevados a cabo por Kintz y cols.<sup>52</sup> y por Offidani y cols.<sup>53</sup>, en los que se relacionan las concentraciones de vello púbico y de cabello de consumidores de COC y/o HER. En la siguiente tabla se reflejan los rangos indicados por estos autores.

**Tabla 11.4.** Niveles de los analitos de interés en muestras de vello púbico y cabello.

Comp	Kintz <sup>52</sup>		Offidani <sup>53</sup>	
	Rango vello púbico (ng/mg)	Rango cabello (ng/mg)	Rango vello púbico (ng/mg)	Rango cabello (ng/mg)
<b>COC</b>	-	-	1,1-166,7	1,7-70
<b>BE</b>	-	-	-	-
<b>COD</b>	-	-	-	-
<b>MOR</b>	0,8-41,3	0,62-27,1	0,18-31,7	0,23-5,3
<b>6-MAM</b>	-	-	-	-

Según estos estudios, la concentración de drogas encontrada en el vello púbico es más alta que la encontrada en el cabello, lo que puede deberse a la menor velocidad de crecimiento del vello púbico y la posible contribución de las glándulas sudoríparas y la orina a este tipo de pelo.

## **11.2.2 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS**

### **11.2.2.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO BÁSICO**

La matriz de correlación ha demostrado que existe una buena correlación entre la COC y la BE en la madre, lo que quiere decir que la concentración de BE aumenta proporcionalmente en todas las muestras al aumentar la concentración de COC. En el recién nacido, sin embargo, se obtuvo una correlación más baja, lo que se explica debido a las diferencias individuales en la placenta que protege a algunos fetos del paso de drogas a través de ella.

Lo mismo se ha observado para los tres opioides estudiados, para los que existe una buena correlación en la madre, es decir, que la concentración de MOR aumenta proporcionalmente en todas las muestras al aumentar la concentración de COD, y lo mismo entre la COD y la 6-MAM y entre la MOR y la 6-MAM. Sin embargo, en el recién nacido solo se ha observado buena correlación entre la MOR y la 6-MAM, entre la COD del recién nacido y los otros dos opioides estudiados no se ha observado correlación alguna.

De la misma forma, se ha demostrado que existe una buena correlación entre las muestras de vello púbico materno y las de cabello del recién nacido para la COC y la BE, es decir, que las concentraciones de COC y de BE en el recién nacido aumentan proporcionalmente en todas las muestras al aumentar la concentración de COC en la madre, y las concentraciones de COC y BE en el recién nacido aumentan proporcionalmente en todas las muestras al aumentar la concentración de BE en la madre.

Ambas muestras también se correlacionan bien para los tres opioides estudiados, excepto nuevamente para la COD del recién nacido que no se correlaciona con los otros dos opioides estudiados en la madre.



### **11.2.2.2 RELACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS POSITIVOS Y NEGATIVOS EN LA MADRE Y EL RECIÉN NACIDO**

Se ha establecido también una relación entre las muestras de vello púbico materno y las de cabello del recién nacido en función de si los resultados de *screening* y/o confirmación han sido positivos o negativos para cada uno de los analitos estudiados. En base a esto se ha observado una buena concordancia en los resultados de positividad y negatividad para los compuestos estudiados (COC: 90%, BE: 92%, COD: 96%, MOR: 97% y 6-MAM: 97%). La mejor concordancia para los opioides no es significativa dado que éstos han sido detectados en un bajo número de casos.

Las pequeñas diferencias observadas en la concordancia de los analitos estudiados pueden ser atribuidas a diferencias de lipofilidad (moléculas más liposolubles atraviesan más rápidamente la membrana placentaria) y al metabolismo<sup>49</sup>.

La falta de concordancia observada se debe sobre todo a la existencia de resultados positivos para la madre y negativos para el recién nacido, lo que puede ser atribuido a la falta de suficiente muestra de cabello en algunos recién nacidos o al escaso consumo materno durante el embarazo.

Esta falta de concordancia también ha sido reflejada en un estudio anterior<sup>48</sup> tras analizar el cabello del recién nacido y de la madre, observando que en algunos recién nacidos, a pesar de las altas concentraciones de BE en el cabello de la madre, el análisis del cabello del recién nacido no presentaba evidencia de BE, lo que refleja la importancia del papel de la placenta en la transferencia de COC al feto.

### **11.2.2.3 RELACIÓN ENTRE EL CONSUMO MATERNO Y LAS POSIBLES ALTERACIONES EN EL RECIÉN NACIDO**

En lo referente a las patologías encontradas en los recién nacidos de Neonatología (NAS, 86%; bajo peso al nacer, 57%; prematuridad y cir, 29%) cabe señalar que en los 7 casos se han encontrado altas concentraciones de COC y BE en la madre, sin embargo, solamente se ha encontrado COC y BE en 5 de los 7 recién nacidos. Otros autores también han encontrado alguno de estos síntomas relacionados con el consumo de COC y/o HER durante la gestación<sup>48,54-58</sup>.

#### **11.2.2.4 INCIDENCIA DEL CONSUMO DE COCAÍNA Y OPIOIDES EN EL EMBARAZO**

La tasa de positivos a COC, opioides o combinación de ambas fue igual o superior en las muestras de vello púbico materno que en las muestras de cabello del recién nacido.

En las dos poblaciones estudiadas se ha podido observar una mayor incidencia en el consumo de COC en comparación con el consumo de COC combinada con opioides, sin embargo, el consumo de opioides sin asociarse a la COC no ha sido observado en ninguno de los casos analizados.

En la población de Obstetricia, el análisis del vello púbico materno y del cabello del recién nacido demostraron una positividad para la COC del 8%, mientras que en la población de Neonatología ambas muestras demostraron una positividad del 41% y del 29%, respectivamente. Se puede observar en la población de Obstetricia una incidencia relativamente baja comparada con la prevalencia de drogas observada en América que se sitúa entre el 0,5 y el 50%, como se ha comentado en el Capítulo 3. La mayor tasa de consumo de COC encontrada en la población de Neonatología puede explicarse si se tiene en cuenta que el 90% de las mujeres incluidas en el estudio eran ex adictas a una o varias drogas y un 35% estaban a tratamiento con metadona.

La entrevista materna realizada en la población de Obstetricia no detectó ningún caso de consumo, ni crónico ni esporádico, de COC y/o HER durante la gestación, sin embargo, en la población de Neonatología el 18% de las madres declararon consumo de drogas durante el embarazo. Estos datos no concuerdan con los obtenidos mediante el análisis de las muestras de vello púbico materno y de cabello del recién nacido, lo que demuestra la utilidad de estas muestras para probar el consumo durante la gestación.

## **11.3 DETERMINACIÓN DE COCAÍNA Y OPIOIDES EN MECONIO POR GC-MS**

### **11.3.1 TRATAMIENTO PREVIO DE LA MUESTRA**

El meconio es una matriz compleja que contiene productos de desecho y pigmentos, por este motivo es necesario realizar un adecuado tratamiento de la muestra. Existen en la bibliografía numerosas publicaciones relativas al tratamiento previo de las muestras de meconio. En la patente original<sup>59</sup>, para el análisis de MOR y BE, el meconio (0,5 g), tomado directamente del pañal del recién nacido, es mezclado con agua destilada (10 mL) y ácido clorhídrico concentrado (1 mL). Este homogeneizado es filtrado a través de lana de vidrio, centrifugado y el sobrenadante es analizado mediante RIA.

Desde este trabajo original han sido publicados otros en los que se proponen tratamientos alternativos de las muestras de meconio. En general, es homogeneizado en un solvente orgánico, como el metanol o el acetonitrilo, en una mezcla de solventes, como acético/acetona y cloroformo/isopropanol o en un tampón, para ayudar a distribuir la droga en toda la matriz.

En esta Tesis han sido probados diferentes tratamientos previos de la muestra (utilizando metanol, acetonitrilo y cloroformo/isopropanol). Finalmente se ha optado por trabajar con metanol, por ser éste el solvente orgánico con el que se han obtenido mejores resultados en cuanto a recuperación.

### **11.3.2 PROCESO DE EXTRACCIÓN**

El método de extracción mediante cartuchos Oasis HLB desarrollado para la determinación de COC, BE, COD, MOR y 6-MAM en muestras de pelo, ha sido aplicado a las muestras de meconio después de observar que se obtenían buenos resultados para la determinación de estos mismos compuestos. La validación de este nuevo método analítico también cumplió todos los criterios de validación, sin embargo, debido a los continuos y numerosos problemas de obturación de los cartuchos como consecuencia de las características de este tipo de muestras, se optó por ensayar otro tipo de relleno, observándose que con los cartuchos Bond Elut Certify se eliminaba este problema a la

vez que se obtenían extractos más “limpios” gracias a la última etapa de lavado con metanol.

Cabe señalar que la SPE es la técnica de referencia para la extracción de la COC y los opioides en estudio de las muestras de meconio, sin embargo algunos autores optan por utilizar la LLE<sup>60</sup>.

### **11.3.3 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE VALIDACIÓN**

El LOD observado para la COC, BE y COD utilizando los cartuchos Oasis HLB fue de 30 ng/g, mientras que para la MOR y la 6-MAM fue de 20 ng/g. La utilización de cartuchos Bond Elut ha permitido obtener LODs considerablemente más bajos, mejorando así la sensibilidad del método. Los límites obtenidos mediante estos cartuchos fueron de 5 ng/g para la COC y la COD y de 10 ng/g para el resto de los analitos estudiados. Esta disminución en los límites de detección puede ser atribuida a que, como ya se ha mencionado en el apartado anterior, la utilización de cartuchos Bond Elut permite la obtención de extractos más “limpios” y por lo tanto los cromatogramas tendrán menos interferencias.

Existen pocos métodos publicados que consigan igualar o superar las sensibilidades obtenidas mediante la utilización de los cartuchos Bond Elut. Solamente se han encontrado tres trabajos en los que se obtienen mejores sensibilidades, pero solamente para el caso de la BE (Abusada y cols.<sup>61</sup>: 6,52 ng/g, Lombardero y cols.<sup>62</sup>: 5 ng/g y Lewis y cols.<sup>63</sup>: 5 ng/g).

En cuanto a los restantes parámetros de validación, ambos métodos analíticos cumplieron todos los criterios en relación con la selectividad, linealidad, precisión, exactitud y rendimiento. No ha sido publicado ningún método completamente validado para la determinación simultánea de los cinco analitos de interés en muestras de meconio mediante GC-MS, por lo que los métodos presentados en esta Tesis son los primeros completamente validados para este fin.

### 11.3.4 APLICACIÓN A CASOS REALES

#### 11.3.4.1 EXTRACCIÓN CON WATERS OASIS® HLB

El método desarrollado ha sido aplicado a 30 muestras de meconio procedentes del Servicio de Neonatología del Hospital Clínico de Santiago de Compostela y remitidas al Servicio de Toxicología del IUMI de Santiago tras observarse una sospecha clínica de consumo de drogas durante el embarazo.

Las concentraciones de los casos positivos a COC oscilaron entre 45,38 y 1864 ng/g, con un valor medio de 783 ng/g para la COC; y entre 50,12 y 1594 ng/g, con un valor medio de 593,2 ng/g para la BE. En el caso de los positivos a los opioides en estudio, las concentraciones de COD oscilaron entre 60,95 y 600,4 ng/g, con un valor medio de 235,2 ng/g; para la MOR entre 124,9 y 825,3 ng/g, con un valor medio de 323,2 ng/g y para la 6-MAM entre 100,9 y 1350 ng/g, con un valor medio de 568,2 ng/g. Estos niveles están en consonancia con los obtenidos en estudios similares realizados por otros autores (Tabla 11.5).

**Tabla 11.5.** Revisión bibliográfica de los niveles de concentración hallados en muestras de meconio.

REFERENCIA	Concentración meconio (ng/g)				
	COC	BE	COD	MOR	6-MAM
DiGregorio <sup>50</sup>	100-560	100-480	-	-	-
ElSohly <sup>60</sup>	35-1519	-	21-144	39-507	-
Abusada <sup>61</sup>	8,3-2918,8	193,1-2666,4	-	-	-
Browne <sup>64</sup>	240-780	-	-	-	-
Casanova <sup>65</sup>	16-2917	112-3090	-	-	-
Lewis <sup>66</sup>	5-10000	5-10000	-	-	-
Moriya <sup>67</sup>	-	487-1730	-	-	-
Oyler <sup>68</sup>	44,2-1294,3	52,7-1296,7	-	-	-

Es necesario señalar que en la mayoría de las muestras de meconio analizadas, la concentración de COC fue mayor que la de BE y la concentración de 6-MAM mayor que la de MOR y COD.

Según algunos autores, la COC y la 6-MAM pueden considerarse como los mejores indicadores diagnósticos del consumo de COC y HER, respectivamente, en las muestras de meconio<sup>69,70</sup>. Este hecho ilustra la acumulación del principio activo y/o metabolitos

primarios de la droga en esta matriz junto con la escasa presencia de metabolitos secundarios, lo que concuerda con estudios previos en modelos animales y humanos que demuestran que las drogas intactas se pueden acumular en el líquido amniótico con la posibilidad de reciclado a la circulación y persistencia en el feto<sup>71,72</sup>, y que los procesos metabólicos y de eliminación en el feto en desarrollo son bastante diferentes de los descritos en adultos<sup>73</sup>.

En base a estos estudios, las altas concentraciones de COC y 6-MAM encontradas en el meconio confirman el consumo materno de COC y HER, respectivamente. Se excluye, por tanto, el consumo de antitusígenos que se dispensan sin receta, analgésicos o preparados antidiarreicos que contienen derivados opiáceos.

#### **11.3.4.2 EXTRACCIÓN CON BOND ELUT CERTIFY®**

El método desarrollado ha sido aplicado a 3 muestras consecutivas del meconio (1<sup>er</sup>, 2<sup>o</sup> y 3<sup>er</sup> día postnacimiento) de un recién nacido con síntomas de hiperexcitabilidad, en cuya madre había sido confirmado el consumo de drogas mediante la técnica EMIT en el propio hospital.

Muestras consecutivas de la orina (14, 34, 60, 80 y 103 horas) del recién nacido también han sido analizadas utilizando el enzimoimmunoensayo COBAS. La confirmación de los casos positivos ha sido realizada mediante GC-MS.

De los análisis de las muestras de orina y meconio se demuestra la existencia de COC, BE, COD y MOR, siendo la BE y la COD los analitos mayoritarios. La presencia de COD en mayor concentración que la MOR, junto con el hecho de que durante las primeras horas de vida del recién nacido no se hayan observado síntomas asociados al síndrome de abstinencia (típico del consumo de HER durante la gestación), nos lleva a pensar que el consumo materno de opioides fue predominantemente COD.

Los análisis de las muestras consecutivas, tanto de orina como de meconio, ponen de manifiesto una disminución de la cantidad de droga a medida que los días pasan, desapareciendo al tercer día postnacimiento. Resultados similares han sido encontrados por otros autores<sup>65,67</sup>.

La presencia de tóxicos en el meconio del segundo día se debe a que la evacuación completa del meconio es lenta, por lo que algunos autores<sup>74</sup> afirman que la detección de droga en el meconio con fines de diagnóstico es factible aún transcurridos 2-3 días desde el parto. Sin embargo, en nuestro estudio hemos observado que el meconio del tercer día está ya libre de droga. Esto se explica debido a que el meconio de los dos primeros días es un meconio que se ha formado en el útero y por lo tanto refleja la exposición a drogas de la madre, mientras que a partir del tercer día las heces son probablemente una mezcla de meconio y de heces formadas después del nacimiento (exentas de droga).

## 11.4 APLICACIÓN A MUESTRAS DE VELLO PÚBLICO MATERNO Y MECONIO

### 11.4.1 RESULTADOS

Los métodos de determinación de COC y opioides en pelo y en meconio (usando extracción con cartuchos Bond Elut Certify) fueron aplicados a 90 muestras pareadas de vello púbico materno y meconio del recién nacido recogidas entre abril y junio de 2007, tal como se ha indicado en el Capítulo 10.

El rango de concentraciones detectado mediante GC-MS en los casos positivos para cada uno de los analitos analizados se resume en la siguiente tabla.

**Tabla 11.6.** Rango y valor medio de las concentraciones detectadas en cada una de las muestras.

Comp	Rango vello púbico (ng/mg)	Valor medio vello púbico (ng/mg)	Rango meconio (ng/g)	Valor medio meconio (ng/g)
<b>COC</b>	0,565-45,41	8,25	10,74-2363	653
<b>BE</b>	0,632-18,72	5,217	16,57-3854	1133
<b>COD</b>	0,518-1,523	0,965	144-5,558	54,85
<b>MOR</b>	4,906-7,347	6,126	2483-24,34	1254
<b>6-MAM</b>	0,564	0,564	0	0

En las muestras de vello púbico positivas puede observarse, en la mayoría de los casos, que la concentración de COC es superior a la concentración de BE. Sin embargo en las muestras de meconio, excepto en un caso, la concentración de BE ha sido superior a la concentración de COC.

En cuanto a los opioides, no es posible establecer una clara relación entre ellos en las muestras de vello púbico y de meconio puesto que no han sido detectados conjuntamente en la mayoría de los casos. Solamente se ha podido establecer relación entre la COD y la MOR en un único caso en el que ambos analitos estaban presentes, siendo la MOR el analito mayoritario tanto en el vello púbico como en el meconio.

En lo referente a la relación entre la concentración de analito encontrada en el vello púbico y en el meconio, cabe indicar que, en la mayoría de los casos, la concentración de analito encontrada en el vello púbico ha sido superior a la encontrada en el meconio.

Estos resultados concuerdan con los indicados en estudios similares (Tabla 11.7).

**Tabla 11.7.** Revisión bibliográfica de los niveles de concentración hallados en muestras de pelo materno y de meconio del recién nacido.

Comp	DiGregorio <sup>50</sup>		Vinner <sup>51</sup>		Potter <sup>75</sup>	
	Rango pelo M (ng/mg)	Rango meconio (ng/g)	Rango pelo M (ng/mg)	Rango meconio (ng/g)	Rango pelo M (ng/mg)	Rango meconio (ng/g)
COC	1,8-421	100-5600	-	-	-	-
BE	1,3-183,6	100-4800	0,8-3,1	0	-	-
COD	-	-	-	-	2,0-27,6	15-162
MOR	-	-	-	-	2,9-16,9	12-2125
6-MAM	-	-	-	-	2,4-32,6	0

Los valores reflejados en la tabla para las muestras maternas se refieren a cabello y no a muestras de vello púbico. No se ha encontrado en la bibliografía ningún estudio donde se relacione el vello púbico materno con el meconio del recién nacido. Sin embargo, tal como se ha explicado anteriormente, algunos estudios establecen que la concentración de drogas encontrada en el vello púbico es más alta que la encontrada en el cabello.

11.4.2 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

11.4.2.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO BÁSICO

La matriz de correlación ha demostrado que existe una buena correlación entre la COC y la BE en la madre, lo que quiere decir que la concentración de BE aumenta proporcionalmente en todas las muestras al aumentar la concentración de COC. En este



caso, a diferencia de lo que ocurría en la aplicación a muestras de vello púbico materno y cabello del recién nacido, la correlación observada entre la COC y la BE en la madre ha sido más baja que en el recién nacido.

Para los opioides estudiados solamente se ha encontrado correlación para la COD y la MOR en el recién nacido, es decir, que la concentración de MOR aumenta proporcionalmente en todas las muestras al aumentar la concentración de COD. Es necesario indicar que los opioides estudiados han sido detectados en un bajo número de casos. La 6-MAM ha sido negativa en el recién nacido en todos los casos y en la madre solo ha sido positiva en uno, donde la concentración encontrada ha sido muy baja, lo que implica que no ha existido consumo de HER en los casos analizados.

De la misma forma, se ha demostrado que existe una buena correlación entre las muestras de vello púbico materno y las de meconio del recién nacido para la COC y la BE, es decir, que las concentraciones de COC y de BE en el recién nacido aumentan proporcionalmente en todas las muestras al aumentar la concentración de COC en la madre, y las concentraciones de COC y BE en el recién nacido aumentan proporcionalmente en todas las muestras al aumentar la concentración de BE en la madre. Sin embargo, para los opioides estudiados no se han podido establecer correlaciones entre la madre y en el recién nacido.

#### **11.4.2.2 RELACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS POSITIVOS Y NEGATIVOS EN LA MADRE Y EL RECIÉN NACIDO**

Se ha establecido también una relación entre las muestras de vello púbico materno y las de meconio del recién nacido en función de si los resultados de *screening* y/o confirmación han sido positivos o negativos para cada uno de los analitos estudiados. En base a esto se ha observado una buena concordancia en los resultados de positividad y negatividad para los compuestos estudiados (COC: 98%, BE: 100%, COD: 98%, MOR: 100% y 6-MAM: 99%). Ostrea y cols.<sup>77</sup> han observado para la COC una mejor correlación en las muestras de cabello materno y meconio del recién nacido (COC: 96% y HER: 73%). En nuestro caso sólo son significativas las correlaciones observadas para la COC, la BE y la COD, pues la MOR y la 6-MAM han sido detectadas en un bajo número de casos.

La falta de concordancia observada se debe sobre todo a la existencia de resultados positivos para la madre y negativos para el recién nacido, lo que puede ser atribuido a la falta de suficiente muestra de meconio en algunos recién nacidos o al escaso consumo materno durante el embarazo.

#### ***11.4.2.3 RELACIÓN ENTRE EL CONSUMO MATERNO Y LAS POSIBLES ALTERACIONES EN EL RECIÉN NACIDO***

En lo referente a las patologías detectadas en uno de los recién nacidos (cir, nacimiento mediante cesárea y bajo peso) cabe señalar que ha sido en el meconio de este recién nacido en el que se ha detectado una mayor concentración de COC y BE. En el vello púbico de la madre también han sido detectadas altas concentraciones de estos analitos, sin embargo, en ambas muestras la concentración de opioides ha sido negativa.

Estos resultados concuerdan con los presentados en un estudio anterior llevado a cabo por Mirochnick y cols.<sup>76</sup> en el que demostraron que la concentración de BE detectada en el meconio del recién nacido está inversamente relacionada con el crecimiento fetal (peso, tamaño y circunferencia de la cabeza al nacer), lo que indica que existe una relación dosis-respuesta entre la exposición prenatal a la COC y el retraso del crecimiento fetal.

#### ***11.4.2.4 INCIDENCIA DEL CONSUMO DE COCAÍNA Y OPIOIDES EN EL EMBARAZO***

La tasa de positivos a COC, opioides o combinación de ambas fue superior en las muestras de vello púbico materno que en las de meconio, lo que concuerda con los resultados obtenidos por otros autores<sup>77-79</sup>.

El análisis del vello púbico materno y del meconio del recién nacido demostraron una positividad para la COC del 4% y del 2%, respectivamente; para los opioides del 3 y del 2%, respectivamente; y para la combinación de COC y opioides del 2% en ambas muestras analizadas. Esta incidencia es relativamente baja si se compara con la prevalencia de drogas observada en América que se sitúa entre el 0,5 y el 50%, como ya se ha comentado anteriormente. Sin embargo esta incidencia ha resultado ser más elevada que la encontrada en dos estudios similares llevados a cabo en Barcelona, donde

el análisis de la orina materna demostró una positividad del 0,8% para la COC y del 1,7% para la HER<sup>80</sup>, y en el otro estudio<sup>70</sup> la prevalencia observada en el meconio fue del 2,6% para la COC y del 4,7% para la HER.

La entrevista materna realizada a las mujeres incluidas en el estudio no detectó ningún caso de consumo, ni crónico ni esporádico, de COC y/o HER durante la gestación, observándose nuevamente una infradeclaración del consumo de drogas por parte de la mujer embarazada.

Es necesario indicar también que mediante sospecha clínica solamente se habría podido detectar la exposición intrauterina a drogas en uno de los 90 recién nacidos (1,1%), en base a los síntomas que éste presentaba (cir, nacimiento mediante cesárea y bajo peso), sin embargo los otros 9 casos positivos, puestos de manifiesto mediante los análisis de ambas muestras, pasarían desapercibidos durante la estancia de la madre y el recién nacido en el hospital, puesto que las madres no se incluían en el perfil típico de consumo y los recién nacidos no manifestaban ningún síntoma. Esto datos ponen de manifiesto que el consumo de ciertas drogas de abuso durante la gestación puede estar infradiagnosticado en el medio hospitalario.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chiarotti M. Overview on extraction procedures. *Forensic Sci Int* 63(1-3) (1993) 161-170.
2. Pragst F, Balikova M A. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clin Chim Acta* 370(1-2) (2006) 17-49.
3. Srogi K. Hair analysis as method for determination of level of drugs and pharmaceutical in human body: Review of chromatographic procedures. *Anal Lett* 39(2) (2006) 231-258.
4. Morrison JF, Chesler SN, Yoo WJ, Selavka CM. Matrix and modifier effects in the supercritical fluid extraction of cocaine and benzoylecgonine from human hair. *Anal Chem* 70(1) (1998) 163-172.
5. Allen DL, Oliver JS. The use of supercritical fluid extraction for the determination of amphetamines in hair. *Forensic Sci Int* 107(1-3) (2000) 191-199.
6. Brewer WE, Galipo RC, Sellers KW, Morgan SL. Analysis of cocaine, benzoylecgonine, codeine, and morphine in hair by supercritical fluid extraction with carbon dioxide modified with methanol. *Anal Chem* 73(11) (2001) 2371-2376.
7. Jurado C, Sachs H. Proficiency test for the analysis of hair for drugs of abuse, organized by the Society of Hair Testing. *Forensic Sci Int* 133(1-2) (2003) 175-178.
8. Offidani C, Strano Rossi S, Chiarotti M. Improved enzymatic hydrolysis of hair. *Forensic Sci Int* 63(1-3) (1993) 171-174.
9. Lucas AC, Bermejo AM, Tabernero MJ, Fernández P, Strano-Rossi S. Use of solid-phase microextraction (SPME) for determination of methadone and EDDP in human hair by GC-MS. *Forensic Sci Int* 107(1-3) (2000) 225-232.
10. Kronstrand R, Nyström I, Josefsson M, Hodgins S. Segmental ion spray LC-MS-MS analysis of benzodiazepines in hair of psychiatric patients. *J Anal Toxicol* 26(7) (2002) 479-484.
11. Fernández P, León M, Bouzas AM, Bermejo AM, Tabernero MJ. Use of high performance liquid chromatography for the determination of cocaine and benzoylecgonine in human hair. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 26(12) (2003) 2003-2012.

12. Baptista MJ, Monsanto PV, Pinho Marques EG, Bermejo A, Avila S, Castanheira, AM, Margalho C, Barroso M, Vieira DN. Hair analysis for delta(9)-THC, delta(9)-THC-COOH, CBN and CBD, by GC/MS-EI. Comparison with GC/MS-NCI for delta(9)-THC-COOH. *Forensic Sci Int* 128(1-2) (2002) 66-78.
13. Cirimele V, Kintz P, Mangin P. Comparison of different extraction procedures for drugs in hair of drug addicts. *Biomed Chromatogr* 10(4) (1996) 179-182.
14. Framil M, Pinero A, Bermejo P, López P, Tabernero MJ, Bermejo AM. Improvements on enzymatic hydrolysis of human hair for illicit drugs determination by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Chem* 79(22) (2007) 8564-8570.
15. Peña-Farfal C, Moreda-Piñeiro A, Bermejo-Barrera A, Bermejo-Barrera P, Pinochet-Cancino H, de Gregori-Hernández, I. Ultrasound bath-assisted enzymatic hydrolysis procedures as sample pretreatment for the multielement determination in mussels by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Anal Chem* 76(13) (2004) 3541-3547.
16. Capelo J L, Ximénez-Embún P, Madrid-Albarrán Y, Cámara C. Anal. Enzymatic probe sonication: enhancement of protease-catalyzed hydrolysis of selenium bound to proteins in yeast. *Anal Chem* 76(1) (2004) 233-237.
17. Bermejo P, Capelo JL, Mota A, Madrid Y, Cámara C. Enzymatic digestion and ultrasonication: a powerful combination in analytical chemistry. *Trends Anal Chem* 23(9) (2004) 654-663.
18. Wolf C, Rösick U, Brätter P. Anal. Bioanal. Sampling and processing of biopsy samples for speciation studies of cytosolic metalloproteins. *Anal Bioanal Chem* 372(3) (2002) 491-494.
19. Franke JP, de Zeeuw RA. Solid-phase extraction procedures in systematic toxicological analysis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 713(1) (1998) 51-59.
20. Peters FT, Maurer HH. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology – A review. *Accred Qual Assur* 7(11) (2002) 441-449.
21. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research (2001) Guidance for industry: Bioanalytical method validation, Rockville, MD.  
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>. Accessed 23 Mar 2010.

22. International Conference on Harmonization (ICH) (1994) Validation of analytical methods: Definitions and terminology ICH Q2A.
23. International Conference on Harmonization (ICH) (1996) Validation of analytical methods: Definitions and terminology ICH Q2B.
24. Harkey MR, Henderson GL, Zhou C. Simultaneous quantitation of cocaine and its major metabolites in human hair by gas chromatography/chemical ionization mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 15(5) (1991) 260-265.
25. Möller MR, Fey P, Rimbach S. Identification and quantitation of cocaine and its metabolites, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester, in hair of Bolivian coca chewers by gas chromatography/mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 16(5) (1992) 291-296.
26. Wang WL, Darwin WD, Cone EJ. Simultaneous assay of cocaine, heroin and metabolites in hair, plasma, saliva and urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Appl* 660(2) (1994) 279-290.
27. Cirimele V, Kintz P, Majdalani R, Mangin P. Supercritical fluid extraction of drugs in drug addict hair. *J Chromatogr B Biomed Appl* 673(2) (1995) 173-181.
28. Kintz P, Cirimele V, Sengler C, Mangin P. Testing human hair and urine for anhydroecgonine methyl ester, a pyrolysis product of cocaine. *J Anal Toxicol* 19(6) (1995) 479-482.
29. Kintz P, Mangin P. Simultaneous determination of opiates, cocaine and major metabolites of cocaine in human hair by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *Forensic Sci Int* 73(2) (1995) 93-100.
30. Gaillard Y, Pépin G. Simultaneous solid-phase extraction on C<sub>18</sub> cartridges of opiates and cocaine for an improved quantitation in human hair by GC-MS: one year of forensic applications. *Forensic Sci Int* 86(1-2) (1997) 49-59.
31. Skender L, Karacić V, Brcić I, Bagarić A. Quantitative determination of amphetamines, cocaine, and opiates in human hair by gas chromatography/mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 125(2-3) (2002) 120-126.
32. de Toledo FC, Yonamine M, de Moraes Moreau RL, Silva OA. Determination of cocaine, benzoylecgonine and cocaethylene in human hair by solid-phase microextraction and gas

chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 798(2) (2003) 361-365.

33. Romolo FS, Rotolo MC, Palmi I, Pacifici R, Lopez A. Optimized conditions for simultaneous determination of opiates, cocaine and benzoylecgonine in hair samples by GC-MS. *Forensic Sci Int* 138(1-3) (2003) 17-26.

34. Gentili S, Cornetta M, Macchia T. Rapid screening procedure based on headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for the detection of many recreational drugs in hair. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 801(2) (2004) 289-296.

35. Cordero R, Paterson S. Simultaneous quantification of opiates, amphetamines, cocaine and metabolites and diazepam and metabolite in a single hair sample using GC-MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 850(1-2) (2007) 423-431.

36. Wu YH, Lin KL, Chen SC, Chang YZ. Simultaneous determination of amphetamines, ketamine, opiates and metabolites in human hair by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 22(6) (2008) 887-897.

37. Moeller MR, Fey P, Wennig R. Simultaneous determination of drugs of abuse (opiates, cocaine and amphetamine) in human hair by GC/MS and its application to a methadone treatment program. *Forensic Sci Int* 63(1-3) (1993) 185-206.

38. Edler P, Staub C, Veuthey JL, Pierroz I, Haerdi W. Subcritical fluid extraction of opiates in hair of drug addicts. *J Chromatogr B Biomed Appl* 658(1) (1994) 75-86.

39. Girod C, Staub C. Analysis of drugs of abuse in hair by automated solid-phase extraction, GC/EI/MS and GC ion trap/CI/MS. *Forensic Sci Int* 107(1-3) (2000) 261-271.

40. Jones J, Tomlinson K, Moore C. The simultaneous determination of codeine, morphine, hydrocodone, hydromorphone, 6-acetylmorphine, and oxycodone in hair and oral fluid. *J Anal Toxicol* 26(3) (2002) 171-175.

41. Pichini S, Pacifici R, Altieri I, Pellegrini M, Zuccaro P. Determination of opiates and cocaine in hair as trimethylsilyl derivatives using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 23(5) (1999) 343-348.

42. Montagna M, Poletti A, Stramesi C, Groppi A, Vignali C. Hair analysis for opiates, cocaine and metabolites. Evaluation of a method by interlaboratory comparison. *Forensic Sci Int* 128(1-2) (2002) 79-83.
43. Acampora A, Della Casa E, Martone G, Miraglia N. Determination of opiates in biological samples through the analysis of heptafluorobutyric derivatives by gas chromatography/negative ion chemical ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 38(9) (2003) 1007-1011.
44. Lachenmeier K, Musshoff F, Madea B. Determination of opiates and cocaine in hair using automated enzyme immunoassay screening methodologies followed by gas chromatographic-mass spectrometric (GC-MS) confirmation. *Forensic Sci Int* 159(2-3) (2006) 189-199.
45. Barroso M, Dias M, Vieira DN, Queiroz JA, López-Rivadulla M. Development and validation of an analytical method for the simultaneous determination of cocaine and its main metabolite, benzoylecgonine, in human hair by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 22(20) (2008) 3320-6.
46. Wu YH, Lin KL, Chen SC, Chang YZ. Integration of GC/EI-MS and GC/NCI-MS for simultaneous quantitative determination of opiates, amphetamines, MDMA, ketamine, and metabolites in human hair. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 870(2) (2008) 192-202.
47. Moller M, Aleksa K, Walasek P, Karaskov T, Koren G. Solid-phase microextraction for the detection of codeine, morphine and 6-monoacetylmorphine in human hair by gas chromatography-mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 196(1-3) (2010) 64-9.
48. Katikaneni LD, Salle FR, Hulsey TC. Neonatal hair analysis for benzoylecgonine: A sensitive and semiquantitative biological marker for chronic gestational cocaine exposure. *Biol Neonate* 81(1) (2002) 29-37.
49. Iwersen S, Schmoldt A, Schulz F, Püschel K. Evidence of gestational heroin exposure by comparative analysis of fetal and maternal body fluids, tissues, and hair in a heroin-related death. *J Anal Toxicol* 22(4) (1998) 296-298.
50. DiGregorio GJ, Ferko AP, Barbieri EJ, Ruch EK, Chawla H, Keohane D, Rosenstock R, Aldano A. Determination of cocaine usage in pregnant women by a urinary EMIT drug screen and GC-MS analyses. *J Anal Toxicol* 18(5) (1994) 247-250.



51. Vinner E, Vignau J, Thibault D, Codaccioni X, Brassart C, Humbert L, Lhermitte M. Hair analysis of opiates in mothers and newborns for evaluating opiate exposure during pregnancy. *Forensic Sci Int* 133(1-2) (2003) 57-62.
52. Kintz P, Traqui A, Mangin P. Opiate concentrations in human head, axillary and pubic hair. *J Forensic Sci* 38(3) (1993) 657-662.
53. Offidani C, Strano Rosi S, Chiarotti M. Drug distribution in the head, axillary and pubic hair of chronic addicts. *Forensic Sci Int* 63(1-3) (1993) 105-108.
54. Frank DA, Zuckerman BS, Amaro H, Aboagye K, Bauchner H, Cabral H, Fried L, Hingson R, Kayne H, Levenson SM, Parker S, Reece H, Vinci R. Cocaine use during pregnancy: Prevalence and correlates. *Pediatrics* 82(6) (1988) 888-895.
55. Gillogley KM, Evans AT, Hansen RL, Samuels SJ, Batra KK. The perinatal impact of cocaine, amphetamine, and opiate use detected by universal intrapartum screening. *Am J Obstet Gynecol* 163 (5 Pt 1) (1990) 1535-1542.
56. Mastrogiannis DS, Decavalas GO, Verma U, Tejani N. Perinatal outcome after recent cocaine usage. *Obstet Gynecol* 76(1) (1990) 8-11.
57. Fundarò C, Genovese O, Rendeli C, Valeri S, De Turris PL, Girlando P, Parenti D, Auriti C, Rossodivita A, Reynaud G, Segni G. Detection of occult fetal exposure to illicit drugs by meconium analysis. *Rivista Italiana di Pediatria* 24(3) (1998) 421-426.
58. Sherwood RA, Keating J, Kavvadia V, Greenough A, Peters TJ. Substance misuse in early pregnancy and relationship to fetal outcome. *Eur J Pediatr* 158(6) (1999) 488-492.
59. Ostrea EM. Method for determining maternally transferred drug metabolites in newborns infants. US Patent 5,015,589. May 14, 1991.
60. ElSohly MA, Stanford DF, Murphy TP, Lester BM, Wright LL, Smeriglio VL, Verter J, Bauer CR, Shankaran S, Bada HS, Walls HC. Immunoassay and GC-MS procedures for the analysis of drugs of abuse in meconium. *J Anal Toxicol* 23(6) (1999) 436-445.
61. Abusada GM, Abukhalaf IK, Alford DD, Vinzon-Bautista I, Pramanik AK, Ansari NA, Manno JE, Manno BR. Solid-phase extraction and GC/MS quantitation of cocaine, ecgonine methyl ester, benzoylecgonine, and cocaethylene from meconium, whole blood, and plasma. *J Anal Toxicol* 17(6) (1993) 353-358.

62. Lombardero N, Casanova O, Behnke M, Eyler FD, Bertholf RL. Measurement of cocaine and metabolites in urine, meconium, and diapers by gas chromatography/mass spectrometry. *Ann Clin Lab Sci* 23(5) (1993) 385-394.
63. Lewis DE, Moore CM, Leikin JB, Koller A. Meconium analysis for cocaine: A validation study and comparison with paired urine analysis. *J Anal Toxicol* 19(3) (1995) 148-150.
64. Browne S, Moore C, Negrusz A, Tebbett I, Covert R, Dusick A. Detection of cocaine, norcocaine, and cocaethylene in the meconium of premature neonates. *J Forensic Sci* 39(6) (1994) 1515-1519.
65. Casanova OQ, Lombardero N, Behnke M, Eyler FD, Conlon M, Bertholf RL. Detection of cocaine exposure in the neonate. Analyses of urine, meconium, and amniotic fluid from mothers and infants exposed to cocaine. *Arch Pathol Lab Med* 118(10) (1994) 988-993.
66. Lewis DE, Moore CM, Leikin JB. Cocaethylene in meconium specimens. *Clin Toxicol* 32(6) (1994) 697-703.
67. Moriya F, Chan KM, Noguchi TT, Wu PYK. Testing for drugs of abuse in meconium of newborn infants. *J Anal Toxicol* 18(1) (1994) 41-45.
68. Oyler J, Darwin WD, Preston KL, Suess P, Cone EJ. Cocaine disposition in meconium from newborns of cocaine-abusing mothers and urine of adult drug users. *J Anal Toxicol* 20(6) (1996) 453-462.
69. Pichini S, Puig C, Zuccaro P, Marchei E, Pellegrini M, Murillo J, Vall O, Pacifici R, García-Algar O. Assessment of exposure to opiates and cocaine during pregnancy in a Mediterranean city: preliminary results of the "Meconium Project". *Forensic Sci Int* 153(1) (2005) 59-65.
70. García Algar O, Vall Combelles O, Puig Sola C, Mur Sierra A, Scaravelli G, Pacifici R, Monleón Getino T, Pichini S. Exposición prenatal a drogas de abuso a través del análisis de meconio en una población de bajo nivel socioeconómico en Barcelona. *An Pediatr* 70(2) (2009) 151-158.
71. Lester BM, ElSohly M, Wright LL, Smeriglio VL, Verter J, Bauer CR, Shankaran S, Bada HS, Walls HH, Huestis MA, Finnegan LP, Maza PL. The maternal lifestyle study: drug use by meconium toxicology and maternal self-report. *Pediatrics* 107(2) (2001) 309-317.
72. Rurak DW, Wright MR, Axelson JE. Drug disposition and effects in the fetus. *J Dev Physiol* 15(1) (1991) 33-44.

73. Corley RA, Mast TJ, Carney EW, Rogers JM, Daston GP. Evaluation of physiologically based models of pregnancy and lactation for their application in children's health risk assessments. *Crit Rev Toxicol* 33(2) (2003) 137-211.
74. Ostrea EM Jr, Asensio D, Naluz A, Simkowski K, Subramanian MG, Abel E. The detection of heroin, cocaine and cannabinoid metabolites in the stools of infants of drug dependent mothers. *Pediatr Res* 21(4 Pt 2) (1987) 240A.
75. Potter S, Klein J, Valiante G, Stack DM, Papageorgiou A, Stott W, Lewis D, Koren G, Zelazo PR. Maternal cocaine use without evidence of fetal exposure. *J Pediatr* 125(4) (1994) 652-654.
76. Mirochnick R, Frank DA, Cabral H, Turner A, Zuckerman B. Relation between meconium concentration of the cocaine metabolite benzoylecgonine and fetal growth. *J Pediatr* 126(4) (1995) 636-638.
77. Ostrea EM Jr, Martier S, Welch R, Brady M. Sensitivity of meconium drug screening in detecting intrauterine drug exposure of infants. *Pediatr Res* 27 (4 Pt 2) (1990) 219A.
78. Ostrea EM Jr, Knapp DK, Tannenbaum L, Ostrea AR, Romero A, Salari V, Ager J. Estimates of illicit drug use during pregnancy by maternal interview, hair analysis, and meconium analysis. *J Pediatr* 138(3) (2001) 344-348.
79. Eyler FD, Behnke M, Wobie K, Garvan CW, Tebbett I. Relative ability of biological specimens and interviews to detect prenatal cocaine use. *Neurotoxicol Teratol* 27(4) (2005) 677-687.
80. Martinez Crespo JM, Antolín E, Comas C, Coll O, Marqués JM, Gual A, Fortuny A. The prevalence of cocaine abuse during pregnancy in Barcelona. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 56(3) (1994) 165-167.



# Capítulo

# 12

## Conclusiones



1. La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas ha demostrado ser una técnica analítica útil en la determinación de cocaína, benzoilecgonina, codeína, morfina y 6-monoacetilmorfina en muestras de pelo y meconio, consiguiendo límites de detección y cuantificación adecuados para los fines propuestos. Todos los parámetros y criterios de validación se situaron dentro de los valores admitidos en las guías de las diferentes organizaciones internacionales.
2. El proceso de extracción utilizado en ambas muestras fue la extracción en fase sólida. El mismo proceso de extracción utilizando columnas Oasis<sup>®</sup> HLB ha proporcionado excelentes rendimientos en las muestras de pelo y meconio, sin embargo en el caso del meconio, con el empleo de columnas Bond Elut Certify<sup>®</sup> se consiguieron límites de detección y cuantificación más bajos.
3. El método de determinación de los cinco analitos en pelo fue aplicado con éxito a muestras de pelo pertenecientes a consumidores de cocaína y/o heroína, siendo la cocaína y la 6-monoacetilmorfina los principales analitos encontrados.
4. El análisis del meconio consecutivo de un recién nacido con síntomas de hiperexcitabilidad ha demostrado que a partir del tercer día las drogas y sus metabolitos desaparecen del meconio.
5. Los métodos analíticos de determinación de los cinco analitos en pelo y meconio fueron aplicados a muestras pareadas de vello púbico materno y cabello del recién nacido y a muestras también pareadas de vello púbico materno y meconio del recién nacido. La incidencia de los opioides, así como de la combinación de cocaína y opioides ha sido baja en los casos analizados, mientras que la incidencia de la cocaína se ha situado entre el 2 y el 41%, observándose una mayor tasa de resultados positivos en las muestras maternas.

6. Se han observado en algunos recién nacidos de madres consumidoras de cocaína, alteraciones clínicas tales como síndrome de abstinencia neonatal, bajo peso, crecimiento intrauterino retardado, parto prematuro y nacimiento mediante cesárea. Sin embargo, en otros recién nacidos expuestos a cocaína y/o opioides en el embarazo, no se ha observado ningún síntoma, por lo que el análisis de estas muestras (pelo y meconio) sirve para detectar este consumo de drogas oculto, proporcionando la base para un tratamiento médico y un seguimiento social adecuado.
7. Se ha constatado una falta de veracidad en las declaraciones de las mujeres embarazadas sobre el consumo de drogas, siendo ésta incompleta o inexistente, lo que convierte al análisis del pelo y del meconio en una herramienta analítica fundamental y con una mayor fiabilidad que la entrevista materna para la identificación de los recién nacidos expuestos a drogas de abuso durante el embarazo.





